

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA MADRID  
REGISTRO GENERAL

Entrada 01 Nº. 200600001180  
02/02/06 16:16:08

**SOBREEXPRESION DE FLAVODOXINA**

**EN NÓDULOS DE LEGUMINOSAS:**

**RETRASO DE LA SENESCENCIA Y**

**TOLERANCIA AL ESTRÉS SALINO**

**TESIS DOCTORAL**

Reg. FC. 40580

**FRANCISCO JOSÉ REDONDO VELA**

Madrid, 2006



La presente Tesis Doctoral fue realizada en el **Departamento de Fisiología y Ecología Vegetal** del **Instituto de Recursos Naturales** del **Centro de Ciencias Medioambientales** perteneciente al **Consejo Superior de Investigaciones Científicas**. Su realización fue posible gracias a una Beca Predoctoral con cargo al proyecto AGL-2001-2393 financiado por el **Ministerio de Ciencia y Tecnología** y una Beca I3P de Postgrado del **Consejo Superior de Investigaciones Científicas**.



## Agradecimientos...

En primer lugar, agradecer a mis Directores de Tesis, Dr. José Javier Pueyo Dabad y Dra. María Mercedes Lucas Sánchez, la oportunidad ofrecida para completar mi formación profesional en el mundo de la investigación. Agradecerles además, la libertad y autonomía prestada junto a un constante seguimiento, apoyo y dedicación.

Quisiera agradecer a mi Tutor en la Universidad Autónoma de Madrid, Dr. Rafael Rivilla Palma, su excelente disposición en el ofrecimiento de sugerencias, consejos y materiales. Del mismo modo, agradecerles a los Drs. Idelfonso Bonilla Mangas, Luis Bolaños Rosa y Francisca Fernández Piñas, la atención prestada y sus siempre interesantes sugerencias.

También, agradecer a mis Tutores en los Trabajos de Inicio a la Investigación, Dr. José Ramón Díaz-Ruíz Alba y Dr. Juan José López Moya, los primeros consejos y detalles en la Biología Molecular de las Plantas.

Quisiera agradecer al resto de los investigadores del Departamento de Fisiología y Ecología Vegetal del Instituto de Recursos Naturales del Centro de Ciencias Medioambientales, la Dra. María Rosario de Felipe Antón, la Dra. Mercedes Fernández Pascual, el Dr. Esteban Manrique Reol, el Dr. José Manuel Pozuelo, el Dr. Fernando Valladares Ros, el Dr. Miguel Ángel Quiñones Gómez y sobre todo, a la Dra. Pilar Golvano Herrero, su magnífica compañía y acertados consejos. Del mismo modo, quisiera agradecerles a todos los investigadores del Centro de Ciencias Medioambientales y a otros muchos que han pasado por él, todos los consejos, ayudas y materiales prestados.

Agradecer igualmente, al personal ayudante del Departamento de Fisiología y Ecología Vegetal, Dña. Carmen Mesa, Dña. Maria Isabel Menéndez, Dña. Francisca Catalán, Dña. Susana Peco, por su atención y ayuda, y fundamentalmente a Dña. Elena González por sus sabios y expertos consejos en el cultivo *in vitro* de tejidos y a D. Cesar Natalio Morcillo por su excelente predisposición al trabajo y sus magníficas inclusiones y cortes para el microscopio.

Quiero dar las gracias a todos mis compañeros de laboratorio, Lola, Teo, Alfonso, Nuria, Claudia, Ana, Beatriz, Mariam, Sonia y Paco, por su amistad, apoyo y compañerismo. Y en especial a Teo por sus sugerencias, comentarios y por todos los momentos del codo con codo que hemos pasado.

Agradecer también, al Servicio de Microscopia Electrónica del Centro de Ciencias Medioambientales, a D. Fernando Pinto, Dña. Sara Paniagua, Dña. Sara Lapole y Dña. Rosario Santos, toda la inmensa ayuda amablemente ofrecida.

Quiero agradecer a todo el personal de gerencia, administración y secretaria, compras y almacén, biblioteca, recepción, mantenimiento y limpieza, toda su ayuda de forma directa o indirecta.

Gracias a todos mis amigos del CCMA, por los buenos momentos que hemos pasado y por las risas que no hemos echado: Fernandisko, Romeo, Erpapa, Balciscueta, Caquitas, Jose, David, Julio, Casimiro, Rafa, Juanito, Paco, Crix, Asun, Sara, Eva, Palmi, Elisa, Marga, José Luis, Arantxa, Bea, Miguel, Nacho, Diana, Susana, Javi, etc.

Por último, dar las gracias a mi familia, por su cariño y comprensión. Sin vuestro apoyo, nada podría haber hecho. Gracias a todos por haber creído en mí.

**A mi familia,  
a Cristina,  
a Braulio.**

## Índice

---

<b>ÍNDICE</b>	<b>1</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS</b>	<b>7</b>
<b>I – INTRODUCCIÓN</b>	<b>13</b>
1. La fijación biológica del nitrógeno en leguminosas	15
1.1. La fijación biológica del nitrógeno	15
1.2. La simbiosis <i>Rhizobium</i> -leguminosa	17
2. Senescencia en nódulos de las leguminosas	25
3. Estrés ambientales	28
3.1. La fijación biológica del nitrógeno en leguminosas en condiciones de salinidad	29
4. Estrés oxidativo	36
4.1. Mecanismos de defensa antioxidante	42
4.1.1. Antioxidantes enzimáticos	44
4.1.1.1. Superóxido dismutasa	44
4.1.1.2. Catalasas	46
4.1.1.3. Peroxidasas	47
4.1.1.4. Enzimas del ciclo ascorbato-glutation	48
4.1.1.5. Ciclo glutatión peroxidasa	51
4.1.2. Antioxidantes no enzimáticos	51
4.1.2.1. Ácido Ascórbico	51
4.1.2.2. Glutathión	52
4.1.2.3. Tocoferoles	54
4.1.2.4. Polifenoles	55
4.1.2.5. Carotenoides	55
4.1.2.6. Poliaminas	56
4.1.2.7. Ferritina	56
5. Flavodoxina	57
6. Objetivos	61
<b>II - MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>63</b>
1. Materiales	65
1.1. Material vegetal	65
1.1.1. <i>Medicago truncatula</i> (Gaertn)	65



1.1.1.1. Cultivo en macetas	65
1.1.1.2. Cultivo en sobres e inoculación	65
1.1.1.3. Condiciones de estrés salino	66
1.1.2. <i>Medicago sativa</i> L.	66
1.1.2.1. Cultivo en sobres e inoculación	66
1.1.2.2. Condiciones de estrés salino	66
1.2. Bacterias	67
1.2.1. Condiciones de crecimiento y medios de cultivo	67
1.2.2. Condiciones de estrés oxidativo	69
1.3. Plásmidos	69
1.4. Oligonucleótidos	69
2. Técnicas moleculares	71
2.1. Purificación de ácidos nucleicos	71
2.1.1. Aislamiento de ADN plasmídico de bacterias	71
2.1.1.1. Aislamiento de ADN plasmídico de <i>Escherichia coli</i>	71
2.1.1.2. Aislamiento de ADN plasmídico de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , <i>Sinorhizobium meliloti</i> y <i>Pseudomonas</i> <i>fluorescens</i>	71
2.1.2. Aislamiento de ADN genómico	72
2.1.3. Aislamiento de ARN total	72
2.2. Construcción de vectores	72
2.3. <i>Southern blot</i>	74
2.3.1. Digestión enzimática, electroforesis y transferencia a membrana	74
2.3.2. Hibridación, lavados e inmunodetección	74
2.4. Amplificación por PCR	75
2.5. Análisis de expresión por RT-PCR	76
3. Técnicas de transformación	76
3.1. Transformación de <i>Escherichia coli</i>	76
3.1.1. Preparación de células electrocompetentes	76
3.1.2. Electroporación	77
3.2. Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	77

3.3. Transformación de <i>Sinorhizobium meliloti</i>	77
3.3.1. Obtención de <i>Sinorhizobium meliloti</i> Rifampicina <sup>R</sup>	77
3.3.2. Conjugación	77
3.4. Transformación de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	78
3.5. Transformación de <i>Medicago truncatula</i>	78
3.5.1. Preparación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	78
3.5.2. Preparación de explantes de <i>Medicago truncatula</i>	79
3.5.3. Transformación	79
3.5.4. Selección y regeneración	80
4. Técnicas bioquímicas	81
4.1. Electroforesis e inmunodetección de proteínas	81
4.1.1. Extracción de proteínas	81
4.1.2. Electroforesis de proteínas y transferencia a membrana	81
4.1.3. Inmunodetección de flavodoxina	82
4.2. Metabolismo oxidativo en nódulos. Actividades enzimáticas y cuantificación de metabolitos antioxidantes	82
4.2.1. Preparación de los extractos	82
4.2.2. Actividad catalasa	83
4.2.3. Actividad superóxido dismutasa	83
4.2.4. Actividad ascorbato peroxidasa	84
4.2.5. Actividad monodehidroascorbato reductasa	84
4.2.6. Actividad dehidroascorbato reductasa	85
4.2.7. Actividad glutation reductasa	85
4.2.8. Determinación de glutation	86
4.3. Actividades enzimáticas del metabolismo del carbono	87
4.3.1. Preparación de los extractos	87
4.3.2. Actividad sacarosa sintasa	87
4.3.3. Actividad fosfoenolpiruvato carboxilasa	87
4.4. Medida de la actividad nitrogenasa	88
4.5. Detección histológica de actividad GUS	88
5. Técnicas de microscopía	89
5.1. Procesamiento de las muestras	89
5.1.1. Inclusión en la resina acrílica LR White. Polimerización a 60° C	89

5.1.2. Inclusión en la resina acrílica LR White.	
Polimerización a -20° C con luz ultravioleta	89
5.1.3. Seccionamiento de las muestras	90
5.2. Microscopia óptica de campo claro	90
5.3. Microscopia electrónica de transmisión. TEM	90
5.4. Microscopia electrónica de barrido a baja temperatura.	
Cryoscanning	90
6. Técnicas bioinformáticas	90
6.1. Diseño y comprobación de oligonucleótidos	90
6.2. Clonajes y digestiones enzimáticas	90
6.3. Consulta de secuencias y alineamientos	91
6.4. Consulta de enzimas metabólicas	91
6.5. Consultas bibliográficas	91
7. Técnicas estadísticas	91
<b>III – RESULTADOS</b>	<b>93</b>
1. Expresión de la proteína flavodoxina de <i>Anabaena variabilis</i> PCC 7119 en bacterias y bacteroides	95
1.1. Expresión de la proteína flavodoxina de <i>Anabaena variabilis</i> PCC 7119 en <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> y <i>Sinorhizobium meliloti</i>	95
1.2. Expresión de la proteína flavodoxina de <i>Anabaena variabilis</i> PCC 7119 en bacteroides de <i>Sinorhizobium meliloti</i>	96
2. Estudio del efecto de la flavodoxina en bacterias sometidas a estrés oxidativo en vida libre	98
3. Efecto de la expresión de flavodoxina en bacteroides sobre el proceso de senescencia natural de los nódulos de <i>Medicago sativa</i>	107
3.1. Nodulación	107
3.2. Fijación de nitrógeno	108
3.3. Metabolismo oxidativo	110
3.4. Metabolismo carbonado	115
3.5. Características estructurales y ultraestructurales	117
4. Efecto de la expresión de flavodoxina en bacteroides de nódulos de plantas de <i>Medicago sativa</i> sometidas a estrés salino	139



4.1. Nodulación en condiciones de salinidad	139
4.2. Fijación de nitrógeno	140
4.3. Metabolismo oxidativo	143
4.4. Metabolismo carbonado	148
4.5. Alteraciones estructurales y ultraestructurales	150
5. Expresión de la proteína flavodoxina de <i>Anabaena variabilis</i> en plantas de <i>Medicago truncatula</i>	171
5.1. Transformación y selección de líneas transgénicas	171
5.2. Expresión del transgén en plantas de <i>Medicago truncatula</i> T <sub>1</sub> -Fld1-43	174
6. Estudios preliminares del efecto de la flavodoxina en plantas transgénicas de <i>Medicago truncatula</i> crecidas en condiciones normales y sometidas a estrés salino	177
6.1. Fijación de nitrógeno	177
6.2. Parámetros morfométricos	178
6.3. Metabolismo oxidativo	180
6.4. Metabolismo carbonado	186
<b>IV – DISCUSION</b>	<b>189</b>
1. Expresión de la proteína flavodoxina de <i>Anabaena variabilis</i> PCC 7119 en bacterias y bacteroides	191
2. Efecto de la flavodoxina en bacterias sometidas a estrés oxidativo en vida libre	192
3. Efecto de la expresión de flavodoxina en bacteroides sobre el proceso de senescencia natural de los nódulos de <i>Medicago sativa</i>	195
4. Efecto de la expresión de flavodoxina en bacteroides de nódulos de plantas de <i>Medicago sativa</i> sometidas a estrés salino	206
5. Expresión de la proteína flavodoxina de <i>Anabaena variabilis</i> en plantas de <i>Medicago truncatula</i>	214
6. Estudios preliminares del efecto de la flavodoxina en plantas transgénicas de <i>Medicago truncatula</i> crecidas en condiciones normales y sometidas a estrés salino	216
7. Efecto de la expresión de flavodoxina en nódulos de leguminosas	219

**V – CONCLUSIONES**

**223**

**BIBLIOGRAFIA**

**227**

**ABREVIATURAS**

**295**

## **Índice de Tablas y Figuras**

<b>Figura 3.3.</b> Expresión de flavodoxina en bacteroides de <i>Sinorhizobium meliloti</i>	<b>97</b>
<b>Figura 3.4.</b> Evaluación de la capacidad protectora de la flavodoxina frente al estrés oxidativo por peróxido de hidrógeno en <i>Escherichia coli</i>	<b>98</b>
<b>Figura 3.5.</b> Evaluación de la capacidad protectora de la flavodoxina frente al estrés oxidativo por metilviológeno en <i>Escherichia coli</i>	<b>99</b>
<b>Figura 3.6.</b> Evaluación de la capacidad protectora de la flavodoxina frente al estrés oxidativo por atrazina en <i>Escherichia coli</i>	<b>100</b>
<b>Figura 3.7.</b> Evaluación de la capacidad protectora de la flavodoxina frente al estrés oxidativo por peróxido de hidrógeno en <i>Sinorhizobium meliloti</i>	<b>101</b>
<b>Figura 3.8.</b> Evaluación de la capacidad protectora de la flavodoxina frente al estrés oxidativo por metilviológeno en <i>Sinorhizobium meliloti</i>	<b>102</b>
<b>Figura 3.9.</b> Evaluación de la capacidad protectora de la flavodoxina frente al estrés oxidativo por atrazina en <i>Sinorhizobium meliloti</i>	<b>103</b>
<b>Figura 3.10.</b> Evaluación de la capacidad protectora de la flavodoxina frente al estrés oxidativo por peróxido de hidrógeno en <i>Pseudomonas fluorescens</i>	<b>103</b>
<b>Figura 3.11.</b> Evaluación de la capacidad protectora de la flavodoxina frente al estrés oxidativo por metilviológeno en <i>Pseudomonas fluorescens</i>	<b>104</b>
<b>Figura 3.12.</b> Evaluación de la capacidad protectora de la flavodoxina frente al estrés oxidativo por atrazina en <i>Pseudomonas fluorescens</i>	<b>105</b>
<b>Figura 3.13.</b> Nodulación	<b>107</b>
<b>Figura 3.14.</b> Actividad fijadora de nitrógeno	<b>109</b>
<b>Figura 3.15.</b> Actividades superóxido dismutasa y catalasa	<b>111</b>
<b>Figura 3.16.</b> Actividades enzimáticas del ciclo ascorbato-glutation	<b>112</b>
<b>Figura 3.17.</b> Glutation	<b>114</b>
<b>Figura 3.18.</b> Actividades sacarosa sintasa y fosfoenolpiruvato carboxilasa	<b>115</b>
<b>Figura 3.19.</b> Microfotografías ópticas de la estructura de los nódulos control	<b>121</b>
<b>Figura 3.20.</b> Microfotografías electrónicas de la ultraestructura de los nódulos control	<b>125</b>
<b>Figura 3.21.</b> Microfotografías ópticas de la estructura de los nódulos cuyos bacteroides expresan flavodoxina	<b>129</b>
<b>Figura 3.22.</b> Microfotografías electrónicas de la ultraestructura de los nódulos cuyos bacteroides expresan flavodoxina	<b>131</b>
<b>Figura 3.23.</b> Microfotografías ópticas de la estructura de los nódulos cuyos bacteroides expresan flavodoxina	<b>135</b>
<b>Figura 3.24.</b> Microfotografías electrónicas de la ultraestructura de los nódulos cuyos bacteroides expresan flavodoxina	<b>137</b>



<b>Figura 3.25.</b> Actividad fijadora de nitrógeno en condiciones de salinidad	142
<b>Figura 3.36.</b> Actividades superóxido dismutasa y catalasa	143
<b>Figura 3.27.</b> Actividades enzimáticas del ciclo ascorbato-glutation	145
<b>Figura 3.28.</b> Glutation	147
<b>Figura 3.29.</b> Actividades sacarosa sintasa y fosfoenolpiruvato carboxilasa	148
<b>Figura 3.30.</b> Microfotografías ópticas de la estructura de los nódulos control sometidos a estrés salino	155
<b>Figura 3.31.</b> Microfotografías electrónica de la ultraestructura de los nódulos control sometidos a estrés salino	157
<b>Figura 3.32.</b> Microfotografías ópticas de la estructura de los nódulos cuyos bacteroides expresan flavodoxina sometidos a estrés salino	161
<b>Figura 3.33.</b> Microfotografías electrónicas de la ultraestructura de los nódulos cuyos bacteroides expresan flavodoxina sometidos a estrés salino	163
<b>Figura 3.34.</b> Microfotografías electrónicas de la ultraestructura del nódulo	167
<b>Figura 3.35.</b> Microfotografías electrónicas de la ultraestructura del nódulo sometidos a estrés salino	169
<b>Figura 3.36.</b> Detección histológica de la actividad $\beta$ -glucuronidasa (Gus) en líneas transgénicas	171
<b>Figura 3.37.</b> Esquema del T-ADN	172
<b>Figura 3.38.</b> Análisis de la inserción del T-ADN en el ADN genómico de plantas de <i>Medicago truncatula</i> mediante <i>southern blot</i>	173
<b>Figura 3.39.</b> Presencia del gen de la flavodoxina en el ADN genómico de plantas de <i>Medicago truncatula</i> mediante amplificación por PCR	174
<b>Figura 3.40.</b> Expresión del gen de la flavodoxina en plantas de <i>Medicago truncatula</i> mediante RT-PCR	175
<b>Figura 3.41.</b> Análisis de la expresión y acumulación de la proteína flavodoxina en plantas de <i>Medicago truncatula</i>	175
<b>Figura 3.42.</b> Actividad fijadora de nitrógeno en condiciones de salinidad	178
<b>Figura 3.43.</b> Actividades superóxido dismutasa y catalasa	181
<b>Figura 3.44.</b> Actividades enzimáticas del ciclo ascorbato glutathione	183
<b>Figura 3.45.</b> Glutation	185
<b>Figura 3.46.</b> Actividades sacarosa sintasa y fosfoenolpiruvato carboxilasa	186

#### IV – DISCUSIÓN

<b>Figura 5.1.</b> Posibles puntos de actuación de la flavodoxina	221
---	-----

# Introducción

---

## **1. La fijación biológica del nitrógeno en leguminosas**

### **1.1. La fijación biológica del nitrógeno**

El nitrógeno es un elemento fundamental para todos los seres vivos. Los organismos emplean el nitrógeno como componente de proteínas, ácidos nucleicos y otras biomoléculas imprescindibles para la vida. Desde el punto de vista nutritivo, casi todos los animales, plantas superiores y microorganismos dependen del nitrógeno combinado.

El nitrógeno, en forma de amonio, nitrato, nitrito y compuestos orgánicos, es relativamente escaso en los suelos y en las aguas. La principal reserva de este elemento se encuentra en la atmósfera terrestre en forma de dinitrógeno (78,03 % del volumen de aire seco). El fuerte enlace triple entre los átomos de nitrógeno lo convierte en una molécula relativamente inerte, que no puede ser asimilada directamente por la mayoría de los seres vivos.

El proceso biológico mediante el cual el nitrógeno atmosférico es convertido en amonio se conoce con el nombre de fijación biológica de nitrógeno. Se trata de un proceso exclusivo de un grupo reducido y heterogéneo de microorganismos procariotas capaces de fijar nitrógeno. Existen microorganismos fijadores de vida libre, que fijan nitrógeno para su propio uso. Además, existen microorganismos fijadores simbióticos que fijan nitrógeno cuando se asocian con plantas y les proveen de este elemento, intercambiándolo por carbono y por un hábitat de protección, como son los nódulos radiculares de las leguminosas. La máxima eficiencia en la fijación biológica del nitrógeno se alcanza como resultado de la asociación simbiótica entre plantas y diversos grupos de bacterias.

Con frecuencia la disponibilidad y concentración del nitrógeno constituye el factor limitante para el crecimiento de los organismos vivos. En los sistemas agrícolas el nitrógeno es el nutriente o requerimiento más limitante, después del agua. A principios del siglo XX, el científico alemán Fritz Haber descubrió cómo acortar el ciclo del nitrógeno fijando químicamente el nitrógeno a elevada temperatura y presión. Creó así fertilizantes nitrogenados que podían ser añadidos directamente al suelo. No obstante, la aportación artificial del nitrógeno por el hombre a los sistemas agrícolas en forma de nitrógeno orgánico y mineral supone un elevado coste y graves problemas ecológicos y de salud adicionales.



No todos los fertilizantes aplicados a los sistemas agrícolas se mantienen para ser asimilados por los cultivos. Algunos son barridos de los campos de agricultura por la lluvia o el agua de riego, y son lixiviados acumulándose en las aguas superficiales y subterráneas. La acumulación excesiva de nitratos y nitritos en los acuíferos utilizables como fuente de agua potable, puede causar disfunción de la glándula tiroidea, disminución del transporte de oxígeno en la sangre, almacenamiento insuficiente de la vitamina A, producción en el estómago de nitrosaminas cancerígenas, etc. En las aguas superficiales, el exceso de nitrógeno puede provocar una eutrofización o enriquecimiento excesivo de nutrientes. La eutrofización es causa de desplazamientos y eliminación de especies dentro del ecosistema contaminado. Por otra parte, el nitrógeno acumulado en los suelos y aguas superficiales, puede retornar a la atmósfera en forma de óxido nítrico ("smog" o niebla tóxica de NO) causante de enfermedades respiratorias como el asma en niños y adultos, o en forma de óxido nitroso (N<sub>2</sub>O) que participa en el efecto invernadero y que forma parte de la lluvia ácida.

Por todo ello, se están explorando prácticas agrícolas alternativas, que sostengan una alta productividad, a la vez que disminuyan los impactos negativos causados por el uso de los fertilizantes. De esta manera, aparece el concepto de sostenibilidad que abarca aspectos tecnológicos, económicos y sociales, y que en el ámbito de los sistemas agrícolas supone el uso adecuado de los recursos naturales para satisfacer las necesidades humanas tratando de mantener y conservar el medio ambiente.

La fijación biológica del nitrógeno, y de manera específica aquella que se da en la simbiosis entre plantas y diversos grupos de bacterias, se enmarca dentro de las prácticas agrícolas sostenibles y respetuosas con el medio ambiente. Dentro de estas asociaciones se encuentran actinobacterias del género *Frankia* y un variado grupo de plantas pertenecientes a nueve familias distintas (Wang y Martínez-Romero, 2000), cianobacterias de los géneros *Nostoc* y *Anabaena* con diversas plantas y finalmente la simbiosis que tiene lugar entre algunas bacterias del orden *Rhizobiales* con plantas de la familia *Leguminosae* y un género de la familia *Ulmaceae*. Debido a que la cantidad de nitrógeno fijado por la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa es ciertamente muy elevada, actualmente, una de las metas agrícolas más importante es aumentar el uso y mejorar el manejo del nitrógeno fijado biológicamente por las leguminosas, por razones tanto alimenticias como económicas, ecológicas y de salud.

La simbiosis *Rhizobium*-leguminosa constituye una ventaja económica y una alternativa ecológica al uso de fertilizantes nitrogenados. Mejora la calidad nutricional

de los suelos agrícolas y los prepara para ser usados con otros cultivos. Tienen probada eficacia en la biorremediación y recuperación de suelos degradados (Sriprang *et al.*, 2002; Pastor *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2004). El elevado contenido proteico de las leguminosas les confiere una gran importancia como fuente de alimento humano y una gran relevancia como forrajeras y componentes de piensos para alimento animal (30% del consumo proteico mundial).

## 1.2. La simbiosis *Rhizobium*-leguminosa

Las bacterias que participan en la simbiosis con las leguminosas y que se engloban colectivamente bajo el término genérico de *Rhizobium* o más comúnmente rizobios, son bacilos aeróbicos Gram-negativos, algunas veces pleomórficos, sin esporas y móviles por flagelos peritricos o mediante un solo flagelo lateral. Los análisis filogenéticos mediante comparaciones de las secuencias de ADN ribosómico 16S, han permitido revisar y actualizar la clasificación de estas bacterias simbióticas. Actualmente se reconocen y aceptan seis géneros con un total de 27 especies pertenecientes a cuatro familias distintas: *Rhizobiaceae* incluye los géneros *Rhizobium* (Frank, 1889) y *Sinorhizobium* (Chen *et al.*, 1988) descrito como *Ensifer* (Casida, 1982; Young, 2003); *Phyllobacteriaceae* que comprende a los géneros *Mesorhizobium* (Jarvis *et al.*, 1997) y *Allorhizobium* (de Lajudie *et al.*, 1998); *Hyphomicrobiaceae* a la que pertenece el género *Azorhizobium* (Dreyfus, 1988); y finalmente la familia *Bradyrhizobiaceae* representada por el género *Bradyrhizobium* (Jordan, 1982). Además se han descrito otras bacterias capaces de establecer simbiosis con leguminosas: *Methylobacterium nodulans* (Sy *et al.*, 2000, Jourand *et al.*, 2004), *Burkholderia tuberum* y *Burkholderia phymatum* (Moulin *et al.*, 2001; Vandamme *et al.*, 2002), *Ralstonia taiwanensis* (Chen *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2003), *Devosia neptunea* (Rivas *et al.*, 2003), *Blastobacter denitrificans* (van Berkum y Eardly, 2002), *Ochrobactrum lupini* (Trujillo *et al.*, 2005).

Por su parte, la familia *Leguminosae* comprende entre 19.000 y 20.000 especies distribuidas en tres subfamilias: *Cesalpinioideae* con numerosas especies tropicales (nodulación descrita en el 28 % de las especies estudiadas), *Mimosoideae* que incluye especies arbóreas (nodulación descrita en el 91 % de las especies estudiadas) y *Papilionoideae* la mayor subfamilia y la que incluye las especies de mayor interés



agronómico (nodulación descrita en el 98 % de las especies estudiadas) (Burity *et al.*, 1989; de Faria, 1989; Lewis *et al.*, 2003).

Los nódulos de las leguminosas son diferentes al resto de los órganos de la planta: son inducidos por estímulos externos, las células invadidas y no invadidas del tejido central desempeñan funciones diferentes y además específicas de la simbiosis, su actividad confiere a la leguminosa la capacidad de crecer independientemente de la fertilización nitrogenada. A su vez, la simbiosis representa una clara ventaja para el microsimbionte: un estado más saludable de la planta conlleva una mayor cantidad de exudados radiculares para alimentar los rizobios del suelo, algunos nódulos producen sustancias que favorecen el crecimiento de los rizobios en el suelo (García-Rodríguez y Toro, 2000; Heinrich *et al.*, 2001; Saint *et al.*, 1993; Scott *et al.*, 1987) y además los nódulos senescentes contienen rizobios tanto en los canales de infección como en el citoplasma de las células senescentes que pueden liberarse a la comunidad microbiana del suelo (Timmers *et al.*, 2000).

En el establecimiento de la simbiosis, la interacción entre la rizobacteria y la leguminosa y la organogénesis nodular son procesos de gran complejidad en los que intervienen numerosos factores estructurales, bioquímicos y genéticos (Doyle, 1998; Cohn *et al.*, 1998; Broughton y Perret, 1999; Long, 2001; Rodríguez-Llorente *et al.*, 2004; Patriarca *et al.*, 2004; Geurts *et al.*, 2005). La planta iniciará el proceso en función de la disponibilidad de nitrógeno combinado en el suelo y de una tasa fotosintética adecuada.

El establecimiento de la simbiosis comienza con el reconocimiento específico entre el rizobio y la planta hospedadora. Se han establecido grupos de inoculación en base al grado de especificidad. Así, una misma especie bacteriana es capaz de establecer simbiosis con diferentes leguminosas, como *Rhizobium leguminosarum*, que puede nodular la planta del guisante y del garbanzo o abordando el caso más extremo, *Sinorhizobium* sp. NGR234 capaz de inducir la nodulación en 232 especies de leguminosas (Puepke y Broughton, 1999). A su vez, una misma planta puede ser nodulada por diferentes especies de rizobios como ocurre con la soja que es infectada tanto por *Sinorhizobium fredii* como por *Bradyrhizobium japonicum*. La especificidad viene determinada por el intercambio de diferentes señales químicas entre los simbioses. Los rizobios son atraídos hacia los pelos radiculares mediante exudados de las raíces (quimiotaxis) y de esta manera, se establecen y proliferan colonizando la rizosfera de las leguminosas en desarrollo (Caetano-Anollés *et al.*, 1988; Gaworzewska

y Carlile, 1982; Kape *et al.*, 1991). Las leguminosas soportan selectivamente el crecimiento de determinadas especies bacterianas en su rizosfera (Savka *et al.*, 2002). La capacidad de colonización de la rizosfera y particularmente el crecimiento en la superficie de la raíz son factores que contribuyen a la competitividad de los rizobios, entendiendo como tal la habilidad de una determinada cepa para colonizar la raíz e inducir la formación de nódulos en presencia de otras cepas (Triplett y Sadowsky, 1992). La raíz de la leguminosa excreta azúcares, aminoácidos, y otros nutrientes así como betainas, compuestos aldónicos y diversos compuestos de naturaleza flavonoide (flavonas, flavononas e isoflavonas). La excreción se localiza fundamentalmente entre el meristemo radical y la zona de emergencia de los pelos radiculares. Los compuestos flavonoides exudados tienen la capacidad de inducir la expresión de los genes bacterianos de nodulación (*nod*, *nol*, y *noe*). La expresión de los genes *nod* está controlada por el activador transcripcional NodD que está codificado por el gen constitutivo *nodD* (Spaink *et al.*, 1987). Esta proteína se activa por la interacción con los compuestos flavonoides específicos de la asociación y se une a la región promotora de los genes *nod* modulando su expresión (Fisher y Long, 1989). La inducción de los genes *nod* (Sánchez *et al.*, 1991; Peters *et al.*, 1986) dará lugar a la producción y liberación de lipo-quito-oligosacaridos específicos de cada simbiosis denominados genéricamente factores Nod (Horvath *et al.*, 1987). Normalmente, los rizobios no producen un único tipo de factor Nod sino combinaciones con diferentes variantes o modificaciones (acetilaciones, fucosilaciones, etc.) (Denairé *et al.*, 1996; Minami *et al.*, 1996; Perret *et al.*, 2000). Dado que las concentraciones del factor Nod son muy bajas (hasta  $10^{-11}$  M), se ha propuesto la existencia de receptores específicos capaces de detectar y reconocer las estructuras específicas de los factores Nod, y activar la cascada de señales (Geurts y Bisseling, 2002).

La liberación de estos factores desencadena en la planta unas respuestas fisiológicas tempranas: despolarización de la membrana plasmática (Erhardt *et al.*, 1992; Felle *et al.*, 1995), reorganizaciones del citoesqueleto celular asociados al movimiento del núcleo de la célula del pelo (Timmers *et al.*, 1999; Harris *et al.*, 2003), variaciones en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  y otros iones (Erhardt *et al.*, 1996; Felle *et al.*, 1998; Cardenas *et al.*, 1999), variaciones en el pH del citosol (Felle *et al.*, 1996), cambios en el balance hormonal (Hirsch y Fang, 1994; Mathesius *et al.*, 2000; Harris *et al.*, 2003) y generación de especies reactivas de oxígeno (Baier *et al.*, 1999). Además existe un control sobre la concentración de estos factores: aumenta la expresión de la chalcona



sintasa (EC 2.3.1.74) (Yang *et al.*, 1992), que es una enzima fundamental en la ruta de síntesis de flavonoides y se induce la expresión de quitinasas (EC 2.3.1.74) que degradan los factores Nod para reducir su concentración o para destruir selectivamente factores Nod no específicos (Heidstra *et al.*, 1994; Staehelin *et al.*, 1994; Ovtsyna *et al.*, 2000). En general, estos factores inducen en la planta la expresión de determinados genes que codifican para unas proteínas denominadas nodulinas que son específicas de los procesos de nodulación e infección (Nap y Bisseling, 1990a). Finalmente se produce la curvatura típica de los pelos radiculares (Nap y Bisseling, 1990b).

En la interacción de los simbios, la atracción está seguida por la adhesión de los rizobios a la superficie de los pelos radicales mediante débiles uniones y finalmente por la fuerte unión a las fibrillas de celulosa de la pared vegetal (Dazzo *et al.*, 1984). En algunas especies de rizobios, se ha descrito la producción de una adhesina dependiente de calcio (Smit *et al.*, 1992). Se ha propuesto que parte de la especificidad de la simbiosis pueda estar determinada por la unión de los polisacaridos de la bacteria a una lectina localizada en la superficie de la raíz (Smit *et al.*, 1992; Hirsch, 1999).

En la mayoría de las leguminosas estudiadas, la infección se produce a través de los pelos radicales mediante la hidrólisis enzimática de la parte más débil de la pared vegetal del pelo (Martínez-Molina y Olivares, 1982; van Spronsen *et al.*, 1994) de modo que los rizobios quedan rodeados y englobados por la pared celular. Finalmente, los rizobios comienzan a penetrar por invaginación de la membrana plasmática, formando el canal de infección (Rae *et al.*, 1992; Gage *et al.*, 2000). Se empieza a acumular material de pared celular y se va formando el canal hacia las células internas de la corteza radical. En otros casos, la infección de las bacterias tiene lugar aprovechando los espacios entre las células (González-Sama *et al.*, 2004) o a través de heridas (*crack infection*) (Chadler, 1978; Dreyfus y Dommergues, 1981). Simultáneamente, ciertas células corticales de la raíz sufren una desdiferenciación y reactivación del ciclo celular (Bieberdorf, 1938; Brewin, 1991; Foucher y Kondorosi, 2000; Newcomb *et al.*, 1979; Taté *et al.*, 1994; Turgeon y Bauer, 1982). Con el comienzo de estas primeras divisiones se establece una estructura que recibe el nombre de primordio nodular (Scheres *et al.*, 1990; Brewin, 1991; Kondorosi *et al.*, 1998). Las células del primordio se dividen muchas veces y en varias direcciones generando grupos de células meristemáticas que acaban uniéndose y forman el meristemo del nódulo (Taté *et al.*, 1994; Timmers *et al.*, 1999). Los canales de infección atraviesan las células del cortex creciendo intracelularmente, sus ramificaciones liberan bacterias a las células de la línea más

proximal al meristemo (zona submeristemática). Estas células cesan su actividad mitótica y comienzan su diferenciación morfológica hasta convertirse en células infectadas o invadidas. De esta forma, desde la zona meristemática se van añadiendo nuevas células infectadas al tejido central.

La liberación de las bacterias al citoplasma celular desde el extremo del canal o de sus ramificaciones, se produce por un proceso que se asemeja a la endocitosis, a través de una estructura característica denominada gota de infección (Rae *et al.*, 1992). Los rizobios quedan incluidos en las vesículas producidas por la invaginación de la membrana celular de la gota de infección. De este modo, tras la liberación las bacterias quedan rodeadas por una membrana de origen vegetal, denominada membrana peribacteroidal. Esta membrana está en estrecho contacto con la bacteria (de Felipe *et al.*, 1997) y la mantiene topológicamente fuera del citoplasma celular (Tu, 1975). La bacteria diferenciada, o bacteroide, junto con la membrana peribacteroidal recibe el nombre de simbiosoma. El simbiosoma puede contener uno o más bacteroides y constituye la unidad fijadora de nitrógeno. La disposición invertida de la membrana peribacteroidal (extracelular frente al bacteroide e intracelular frente al citosol) debida al englobamiento de la bacteria por parte de la membrana de la célula (Brewin, 1991; Verma y Hong, 1996) conlleva algunas particularidades en el intercambio de metabolitos: excrección hacia el bacteroide e importación desde el bacteroide.

En general, se han descrito dos tipos básicos de nódulos radiculares en las leguminosas en función de la persistencia del meristemo del nódulo, de la vascularización, y del desarrollo de los bacteroides (Hirsch, 1992; Lodwing y Poole, 2003; Patriarca *et al.*, 2004). Los nódulos de tipo determinado presentan una zona meristemática periférica no persistente que determina su crecimiento esférico durante un periodo limitado de tiempo. Las etapas del desarrollo nodular están separadas en el tiempo (Nap y Bisseling, 1990b). El sistema vascular rodea completamente a la zona central. Los nódulos de tipo indeterminado presentan un meristemo apical y persistente. Adquieren una forma alargada y cilíndrica, a menudo ramificada, debido al crecimiento prolongado del meristemo. Las etapas del desarrollo nodular están separadas espacialmente (Nap y Bisseling, 1990b). El sistema vascular queda abierto en las proximidades del meristemo apical.

En los nódulos completamente desarrollados se distinguen un tejido periférico y un tejido central. El tejido periférico a su vez está constituido por la corteza externa, la endodermis y el parénquima o corteza interna. El tejido central contiene las células



infectadas que realizan la fijación simbiótica del nitrógeno. Su disposición varía dependiendo del tipo de nódulo (para revisión ver Patriarca *et al.*, 2004). En la sección longitudinal de los nódulos indeterminados se distinguen diferentes zonas desde la parte apical hasta su conexión con la raíz: zona meristemática ( $Z_I$ ), zona de preinfección o invasión ( $Z_{II}$ ), interzona ( $Z_{II-III}$ ), zona infectada activa de fijación nitrógeno ( $Z_{III}$ ) y zona senescente inactiva en la fijación ( $Z_{IV}$ ). Se ha descrito una quinta zona formada por células completamente senescentes que son nuevamente invadidas por los rizobios que acceden desde canales de infección remanentes (Timmers *et al.*, 2000). Los nódulos determinados carecen de esta zonación típica. No obstante, aunque tradicionalmente se ha considerado que todas las células se encuentran en el mismo estado de desarrollo, Tate *et al.* (1994) han propuesto un gradiente de diferenciación en nódulos de judía. En el tejido central encontramos células infectadas y no infectadas (intersticiales) con diferentes funciones metabólicas.

En las células infectadas, los bacteroides diferenciados adquieren la capacidad de reducir el nitrógeno atmosférico mediante el complejo nitrogenasa. Este complejo está formado por dos enzimas: dinitrogenasa (molibdoferroproteína o proteína I) y dinitrogenasa reductasa (ferroproteína o proteína II) (Figura 1.1). El componente I se une al nitrógeno ( $N_2$ ) y lo reduce a amoníaco ( $NH_3$ ) con los electrones que el componente II le transfiere desde un transportador electrónico y gracias a la energía de hidrólisis del ATP (adenosin trifosfato) según la siguiente reacción:



La acidificación del espacio peribacteroidal mediante bombas ATPasas de protones (Blumwald *et al.*, 1985; Udvardi *et al.*, 1991) promueve la formación del ión amonio ( $NH_4^+$ ) a expensas del amoníaco (Figura 1.1). De esta manera, se mantiene el gradiente de concentración de amoníaco que impulsa su transporte por simple difusión desde el bacteroide hasta el espacio peribacteroidal. Los sistemas de transporte de amonio descritos en los rizobios en vida libre están inoperativos o son reprimidos en la forma simbiótica (Howitt *et al.*, 1986; Taté *et al.*, 1998). De esta forma, se impide la interferencia o competencia con los sistemas de importación de amonio en la célula infectada a través de la membrana peribacteroidal (Udvardi y Day, 1997; Howitt y Udvardi, 2000) (Figura 1.1). Se han propuesto canales de iones (Tyerman *et al.*, 1995; Mouritzen y Rosendahl, 1997) y aquoporinas (Niemietz y Tyerman, 2000) como



sistemas para el transporte del amonio desde el espacio peribacteroidal hasta el citosol de la célula infectada (Figura 1.1).

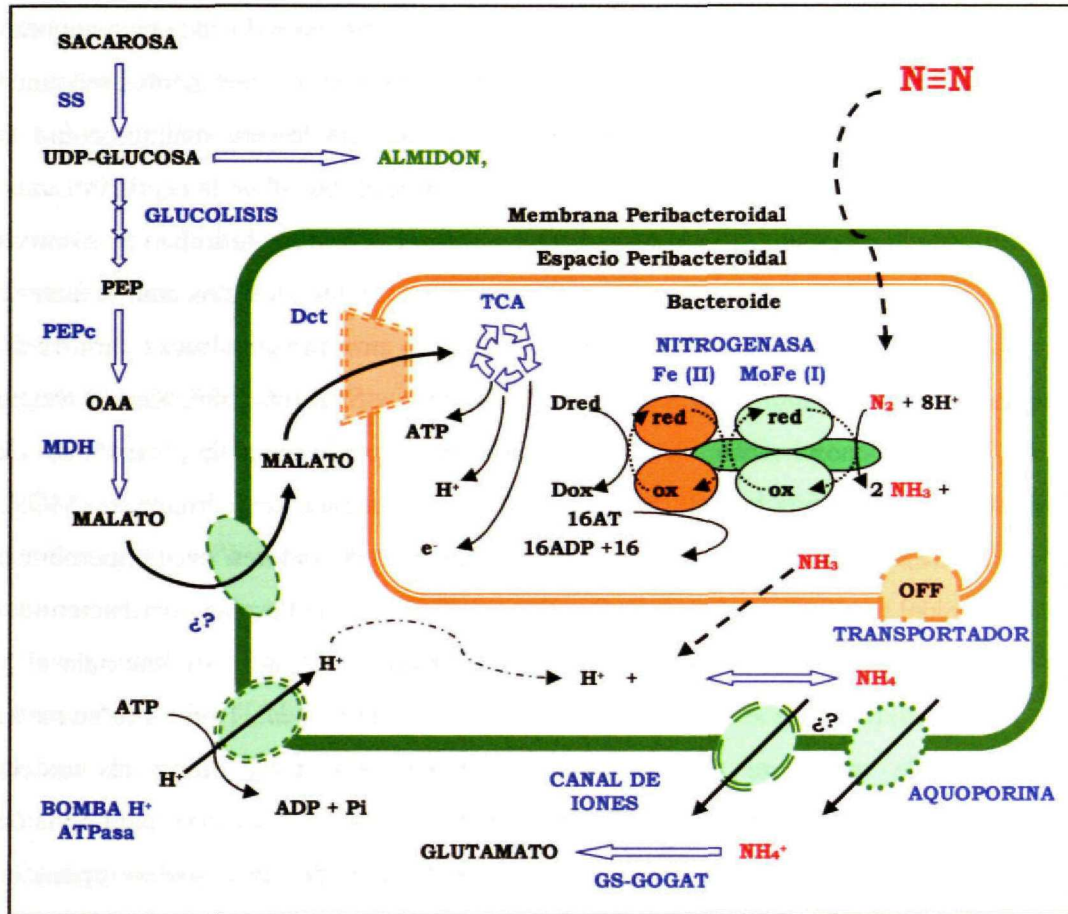


Figura 1.1. **Representación esquemática del intercambio de nutrientes entre el bacteroide y la célula vegetal.** Dct, transportador de dicarboxílicos; GS-GOGAT, glutamina sintetasa / glutamato sintasa; MDH, malato deshidrogenasa; OAA, ácido oxalacético; PEP, fosfoenolpiruvato; PEPc, PEP carboxilasa; SS, sacarosa sintasa; TCA, ciclo de los ácidos tricarboxílicos.

El amonio es rápidamente asimilado por las células vegetales a través de la ruta glutamina sintetasa / glutamato sintasa (GS-COGAT) en forma de glutamato (Kennedy, 1966a; 1966b). A partir del glutamato se originarán diferentes formas nitrogenadas para transportar el nitrógeno fijado. En los nódulos indeterminados (*Medicago*, *Pisum*, *Vicia*, etc.) se forman amidas, principalmente asparagina y glutamina (Vance, 2000). En nódulos determinados (*Glycine*, *Vigna*, *Phaseolus*, etc.) se forman ureidos, principalmente alantoína, ácido alantoico y citrulina (Atkins y Smith, 2000).

El carbono suministrado como fuente de energía para el proceso de fijación del nitrógeno en los bacteroides procede de los fotosintatos transportados al nódulo en

forma de sacarosa a través del floema (Streter, 1987; Gordon *et al.*, 1985). La membrana peribacteroidal es prácticamente impermeable al transporte activo de azúcares (sacarosa, fructosa y glucosa) desde el citosol hasta el bacteroide (Udvardi *et al.*, 1988, 1990) y las tasas de transporte pasivo son demasiado reducidas para soportar la actividad de la nitrogenasa (Udvardi *et al.*, 1990). Diferentes experimentos señalan a los ácidos dicarboxílicos, succinato, fumarato y fundamentalmente malato, como la fuente de carbono y energía suplidos al bacteroide desde el citosol de la célula infectada (Day y Copeland, 1991). La sacarosa sintasa (SS) (EC 2.4.1.13) hidroliza la sacarosa para dar UDP-glucosa y fructosa que pueden ser usados como sustratos para la síntesis de celulosa y almidón y/o catabolizados mediante las enzimas glicolíticas para rendir fosfoenolpiruvato (Thummler y Verma, 1987; Reibach y Streeter, 1983; Kaur y Singh, 1999). El fosfoenolpiruvico es metabolizado para producir malato mediante la fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPc) (EC 1.1.1.37) y la malato deshidrogenasa (MDH) (EC 1.1.1.37). Se ha propuesto la existencia de transportadores en la membrana peribacteroidal para el paso de los ácidos dicarboxílicos hasta el espacio peribacteroidal (Udvardi *et al.*, 1991) aunque, no está claramente definida su naturaleza y funcionamiento (Ouyang *et al.*, 1991; Lee *et al.*, 1995; Dean *et al.*, 1999). Por su parte, el sistema de transporte de los ácidos dicarboxílicos (Dct) desde el espacio peribacteroidal hasta el bacteroide está ampliamente estudiado y descrito (para revisión ver Ludwig y Poole, 2003). En el bacteroide, los ácidos dicarboxílicos son incorporados al ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) para rendir energía (ATP), poder reductor y protones (Figura 1.1).

Recientemente Ludwig *et al.* (2003), a raíz de diferentes estudios en nódulos de plantas de guisante con mutantes de *Rhizobium leguminosarum* (Watson y Rastogi, 1993; Walshaw y Poole, 1996; Hosie *et al.*, 2001, 2002), han sugerido un nuevo modelo en el que incluyen un complejo ciclo de aminoácidos. Proponen que la planta, además de ácidos dicarboxílicos, proporciona a los bacteroides ciertos aminoácidos, probablemente glutatamato u otro precursor suyo, formados a partir del amonio suministrado por los bacteroides a la planta. Estos aminoácidos actuarían como donadores en la transaminación para la formación de aspartato (u otros aminoácidos como la alanina) a partir del oxalacetato del ciclo TCA, mediante la aspartato aminotransferasa (Aat, EC. 2.6.1.1) (Watson y Rastogi, 1993), para ser devuelto a la planta. Para la importación y exportación de aminoácidos a través de la membrana del bacteroide, se han propuesto ciertos transportadores específicos, Aap/Bra (Walshaw y



Poole, 1996; Hosie *et al.*, 2001, 2002). Para sortear la impermeabilidad de la membrana peribacteroidal, sugieren diferentes hipótesis, algunas de ellas apoyadas en sistemas de transporte definidos cinéticamente. Consideran que el ciclo de los aminoácidos constituye un mecanismo evolutivo para impedir el control absoluto de la planta sobre la simbiosis proporcionando una presión selectiva positiva sobre la condición mutualista de la interacción (Lodwig *et al.*, 2003).

La actividad nitrogenasa tiene un elevado coste energético (Dixon *et al.*, 1981) y una extremada sensibilidad al oxígeno (Mendel y Schwarz, 1999). El ambiente microaeróbico del nódulo permite la actividad nitrogenasa sin interferir con la tasa de respiración bacteriana necesaria para suministrar la energía (Poole y Allaway, 2000). El ambiente microaeróbico se consigue mediante la acción de la barrera de resistencia a la difusión de oxígeno (Witty *et al.*, 1987; Mashepohl *et al.*, 1993; de Lorenzo *et al.*, 1994; Iannetta *et al.*, 1995; Serraj y Sinclair, 1996; Witty y Minchin, 1998), la actividad de la leghemoglobina (Wittenberg *et al.*, 1975; Bergersen, 1982; Appleby, 1984; O'Brian, 1996) y la adecuada tasa de respiración del bacteroide (Delgado *et al.*, 1998; Poole y Allaway, 2000). La enzima anhidrasa carbónica (EC. 4.2.1.1) se expresa en la corteza interna del nódulo (Coba de la Peña *et al.*, 1997) y podría estar implicada en el control de la difusión del oxígeno (Gálvez *et al.*, 2000).

## 2. Senescencia en nódulos de las leguminosas

La senescencia es un proceso de envejecimiento biológico que incluye una secuencia de alteraciones estructurales, fisiológicas y bioquímicas comprendidas en las etapas finales del desarrollo, desde la completa madurez hasta la muerte celular. En los nódulos, la senescencia es un proceso degenerativo que se inicia en el tejido fijador de nitrógeno y que está considerada como el último estadio en el desarrollo normal del nódulo.

Las especies leguminosas de porte arbóreo y arbustivo tienen grandes nódulos perennes de aspecto leñoso mientras que las especies anuales de crecimiento rápido, tienen pequeños nódulos con una vida relativamente corta (Puppo *et al.*, 2005). La longevidad de los nódulos se define como el periodo comprendido entre el comienzo de la fijación de nitrógeno y la desintegración final del tejido simbiótico. La duración del periodo funcional depende de la especie de leguminosa, de la cepa del rizobio y de las condiciones ambientales (Sutton, 1983). Algunos autores sugieren que la planta controla

la longevidad de los nódulos de igual modo que ejerce un control sobre el número y desarrollo de los nódulos en el establecimiento de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa mediante el intercambio de metabolitos y la señalización de las rutas de hormonas (Lodwig *et al.*, 2003; Fergusson y Mathesius, 2003; Oldroyd *et al.*, 2001).

Del mismo modo que hay diferencias estructurales y de desarrollo en los dos tipos básicos de nódulos, determinados e indeterminados (Hirsch, 1992; Lodwing y Poole, 2003; Patriarca *et al.*, 2004), existen diferencias en el proceso de senescencia y en la localización de los tejidos senescentes dentro del nódulo (para revisión ver Puppo *et al.*, 2005). Los nódulos determinados presentan una zona meristemática periférica no persistente que determina su crecimiento esférico durante un periodo limitado de tiempo. El comienzo de la senescencia se localiza en la parte central y se establece un gradiente radial de senescencia hacia la zona más externa. Los nódulos indeterminados presentan un meristemo apical y persistente que determina su crecimiento alargado, cilíndrico y a menudo ramificado, y establece un gradiente de desarrollo. La zona IV o de senescencia está localizada en la parte más cercana a la raíz y no esta presente en las primeras etapas del desarrollo del nódulo. Durante el proceso de senescencia, la zona IV se extiende progresivamente hasta el meristemo apical. Ambos tipos de nódulos senescentes, determinados e indeterminados, pueden liberar bacterias de vida libre (Müller *et al.*, 2001).

Durante el proceso de senescencia del nódulo se producen alteraciones estructurales, fisiológicas y bioquímicas (Puppo *et al.*, 2005). Algunas de ellas, como el cambio de coloración, pueden ser directamente observadas. El cambio de la coloración rojiza de los tejidos fijadores de los nódulos maduros hasta una coloración verde es debido a las oxidaciones de la leghemoglobina ( $Lb^{2+}$ ) hasta radicales ( $Lb^{\bullet}$ ) que a su vez evolucionan hasta moléculas más estables, mediante conjugaciones intermoleculares, para dar dímeros, y conjugaciones intramoleculares que forman pigmentos verdes (Swaraj y Bishnoi, 1996). Se ha descrito la acumulación de  $H_2O_2$  en apoplastos de la zona central senescente de nódulos de soja (Alessandrini *et al.*, 2003) y rodeando los bacteroides de la zona senescente de nódulos de alfalfa (James *et al.*, 2004). A nivel celular también tienen lugar alteraciones ultraestructurales. En nódulos determinados, donde hay una clara ausencia de zonación, es frecuente encontrar células en avanzado estado senescente rodeando o cercanas a otras en un estadio funcional o senescente temprano (Puppo *et al.*, 2005). El citoplasma de las células senescentes del nódulo presenta alteraciones en la densidad a los electrones y presenta numerosas vesículas. El



deterioro de los bacteroides produce cambios en el tamaño y forma de los simbiosomas hasta su completo colapso. El daño a las membranas y en especial a la del simbiosoma, podría ser una de las primeras alteraciones del proceso de senescencia (Pladys y Rigaud, 1985; Puppo *et al.*, 1991). Sin embargo, en los nódulos de lupino las alteraciones ultraestructurales en la membrana del simbiosoma no se observan hasta estadios senescentes avanzados (Hernandez-Jimenez *et al.*, 2002). El deterioro y ruptura de esta estructura supone el cese del correcto funcionamiento de la simbiosis ya que regula el intercambio de señales y metabolitos entre los simbiosomas. Igualmente también se producen alteraciones en los orgánulos subcelulares. El número de peroxisomas aumenta considerablemente y las mitocondrias forman complejas estructuras alargadas. Existe un mayor acúmulo de ferritina en los plastidios (Lucas *et al.*, 1998). El descenso de la actividad fijadora de nitrógeno del nódulo se desarrolla paralelamente al descenso de los niveles de leghemoglobina durante el proceso de senescencia natural (Pladys y Rigaud, 1985; Dalton *et al.*, 1986; Lahiri *et al.*, 1993). El descenso de la actividad fijadora de nitrógeno debido a la incidencia de un estrés ocurre antes de que pueda ser apreciado cualquier descenso en los niveles de leghemoglobina (Escuredo *et al.*, 1996; Gogorgena *et al.*, 1997; Matamoros *et al.*, 1999; González *et al.*, 2001). Se ha descrito la activación de enzimas hidrolíticas y la movilización de proteínas en las etapas finales del proceso de senescencia (Malik *et al.*, 1981). Si bien no se ha detectado la actividad de proteasas del bacteroide (Pfeiffer *et al.*, 1983), un amplio conjunto de proteasas de la planta participan en la caída y movilización de las proteínas del nódulo. Se han clonado e identificado una gran variedad de proteasas (cistein-proteasas, tiol-proteasas, aspartato-proteasas, etc.) de tejidos senescentes de plantas (Smart *et al.*, 1995; Drake *et al.*, 1996; Cercos *et al.*, 1999). Las tiol-proteasas parecen tener un papel importante en los nódulos senescentes de soja (Malik *et al.*, 1981), judía (Pladys *et al.*, 1991) y alfalfa (Pladys y Vance, 1993). En plantas se han identificado genes homólogos de las cistein-proteasas (caspasas) que se activan en la apoptosis animal. Aunque en nódulos no se han identificado homólogos de estas caspasas, sí se ha descrito la expresión de ciertas cistein-proteasas vacuolares (Fedorova *et al.*, 2002; Oh *et al.*, 2004). La activación de cistein-proteasas ha sido correlacionada con la senescencia de nódulos (Kardailsky y Brewin, 1996; Naito *et al.*, 2000; Alessandrini *et al.*, 2003). Como consecuencia del incremento proteolítico en el nódulo se producen alteraciones que afectan al microsimbionte. A veces los bacteroides sufren fragmentaciones en su ADN (Kobayashi *et al.*, 2001). Los bacteroides tienen más probabilidades de supervivencia de modo

saprofítico en el tejido senescente que las bacterias en vida libre en la rizosfera (Timmers *et al.*, 2000; Hernández-Jiménez *et al.*, 2002).

Existen muchos trabajos que correlacionan los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS del inglés “reactive oxygen species”) y antioxidantes con la senescencia natural e inducida de los nódulos de las leguminosas (Dalton *et al.*, 1991, 1993b; de Lorenzo *et al.*, 1994; Escuredo *et al.*, 1996; Evans *et al.*, 1999; Becana *et al.*, 2000; Matamoros *et al.*, 1999, 2003; Hernández-Jiménez *et al.*, 2002; Groten *et al.*, 2005).

### 3. Estrés ambientales

El estrés ambiental es el efecto producido por un factor externo que dista del óptimo y que actúa sobre la planta generando una respuesta. El concepto de estrés en plantas fue desarrollado e introducido por Levitt en 1960. Los factores ambientales externos que actúan sobre las plantas pueden ser bióticos o abióticos. Los factores bióticos hacen referencia a las interacciones de las plantas con el resto de especies del sistema. La competencia de recursos, las alelopatías negativas, la depredación o el parasitismo son claros ejemplos de factores bióticos negativos que generan estrés en las plantas y que a menudo se reflejan en variadas fitopatologías. Los factores abióticos engloban a todos los factores físico-químicos que tienen incidencia o relevancia sobre las plantas. La irradiación o intensidad lumínica, la salinidad, la disponibilidad de agua y nutrientes o la temperatura son algunos factores abióticos que por falta o exceso generan estrés en las plantas.

Como consecuencia del estrés ambiental las plantas generan diferentes respuestas dependiendo de las características del estrés (severidad, duración, combinación de estreses, etc.). Las plantas desarrollan resistencias, tolerancias, variaciones epigenéticas, variaciones somáticas y mutaciones o respuestas de susceptibilidad que dan como resultado aclimataciones y adaptaciones o conducen a la muerte de la planta (Gaspar *et al.*, 2002). Diferentes estreses ambientales activan similares vías de señalización celular (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2000; Knight y Knight, 2001; Zhu, 2001b; 2002) y desencadenan respuestas que incluyen la producción de proteínas de estrés, regulación de antioxidantes y acumulación de fitohormonas y solutos compatibles (Vierling y Kimpel, 1992; Zhu *et al.*, 1997; Cushman y Bonhert, 2000). La incidencia de los factores bióticos y abióticos en las plantas es causa de importantes pérdidas en los cultivos a nivel mundial (Boyer, 1982). Numerosos autores consideran el daño



oxidativo como un estrés secundario derivado de las perturbaciones ambientales. El aumento de los niveles de ROS y el descenso de los sistemas antioxidantes, se han asociado a multitud de estreses ambientales (Scandalios *et al.*, 1997; Zhu, 2001a; Mitler, 2002; Jiang y Zhang, 2002; Mithofer *et al.*, 2004).

La simbiosis *Rhizobium*-leguminosa es especialmente sensible a las alteraciones ambientales. Diferentes estreses ambientales como salinidad (Comba *et al.*, 1998; Zahran, 1999; Swaraj y Bishnoi, 1999; Aydi *et al.*, 2004; Verdoy *et al.*, 2004), sequía (Gorgocena *et al.*, 1995; Zahran, 1999; Serraj, 2003; Curtis *et al.*, 2004; Verdoy *et al.*, 2004), heladas (van Heerden y Kruger, 2004), oscuridad (Swaraj *et al.*, 1994; Gorgocena *et al.*, 1997; Matamoras *et al.*, 1999a; Hernández-Jimenez *et al.*, 2002), nitratos (de Lorenzo *et al.*, 1990, 1994; Swaraj *et al.*, 1993; Escuredo *et al.*, 1996; Matamoras *et al.*, 1999), defoliación (Vance *et al.*, 1979), metales pesados (Wu *et al.*, 1994; Obbard y Jones, 2001; Pastor *et al.*, 2003; Chaudhary *et al.*, 2004), herbicidas y pesticidas (Sprout *et al.*, 1992; Madhavi *et al.*, 1993; Zablotowicz y Reddy, 2004) producen un incremento del daño oxidativo y la senescencia prematura de los nódulos.

### 3.1. La fijación biológica del nitrógeno en leguminosas en condiciones de salinidad.

Aproximadamente el 20 % del total de las tierras cultivadas y más del 50 % de las tierras de regadío están seriamente afectadas por la salinidad (Rhoades y Loveday, 1990; Flowers y Yeo, 1995). Según algunas predicciones, en el año 2050 cerca del 50 % del total de las tierras cultivadas se verán afectadas por la salinidad (Asrhaf, 1994). La mayoría de las plantas cultivables son muy susceptibles a la salinidad, viéndose afectada notablemente su productividad (Tabla 1.1) (Maas, 1990; Chinnusamy *et al.*, 2005). Según la USDA (Departamento de Agricultura de los Estados Unidos), la salinidad debe ser definida en términos de conductividad eléctrica ( $EC_e$ ). La mayoría de los cultivos son susceptibles incluso a condiciones de salinidad donde  $EC_e < 4 \text{ dS m}^{-1}$  ( $34.2 \text{ mol m}^{-3}$  NaCl) (Chinnusamy *et al.*, 2005).

La incidencia de la salinidad en el medioambiente tiene dos componentes: la salinidad primaria o natural, que procede de la acumulación de sales mediante procesos naturales (desgaste por acción atmosférica de carbonatos y sulfatos salinos y deposición de sales oceánicas por la lluvia y el viento), y la salinidad secundaria o derivada de las actividades del hombre mediante la modificación del balance hidrológico del suelo. El estrés salino genera un desequilibrio iónico (citotoxicidad) y un estrés hiperosmótico en



las plantas. La citotoxicidad iónica procede fundamentalmente del reemplazo del  $K^+$  por el  $Na^+$  en las reacciones bioquímicas provocando cambios conformacionales y pérdida de la funcionabilidad de las proteínas, y la interacción del  $Na^+$  y  $Cl^-$  con los aminoácidos. Como consecuencia de los desequilibrios metabólicos procedentes de la citotoxicidad iónica, el estrés hiperosmótico y la deficiencia nutricional del estrés salino, aparece un estrés oxidativo (Zhu, 2001a, 2001b, 2002; Chinnusamy *et al.*, 2005).

Tabla 1.1. *Susceptibilidad a la salinidad de los principales cultivos*

Planta	Umbral Salinidad (dS m <sup>-1</sup> )	Disminución Producción (%)
Patata ( <i>Solanum tuberosum</i> L.)	1,7	12
Trigo ( <i>Triticum aestivum</i> L.)	6,0	7,1
Arroz ( <i>Oryza sativa</i> L.)	3,0	12
Maiz ( <i>Zea mays</i> L.)	1,7	12
Tomate ( <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.)	2,5	9,9
Berenjena ( <i>Solanum melongena</i> L.)	1,1	6,9
Col ( <i>Brassica oleracea</i> L.)	1,8	9,7
Caña de azúcar ( <i>Saccharum officinarum</i> L.)	1,7	5,9
Remolacha ( <i>Beta vulgaris</i> L.)	7,0	5,9
Cebada ( <i>Hordeum vulgare</i> L.)	8,0	5
Algodón ( <i>Gossypium hirsutum</i> L.)	7,7	5,2
Ajo ( <i>Allium cepa</i> L.)	1,2	16
Pimiento ( <i>Capsicum annuum</i> L.)	1,5	14
Soja ( <i>Glycine max</i> L. Merr.)	5,0	20
Judía ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	1,0	19
Cacahuete ( <i>Arachis hypogaea</i> L.)	3,2	29
Alfalfa ( <i>Medicago sativa</i> L.)	4,0	20

Los genes que participan en la respuesta de las plantas al estrés salino se clasifican en tres categorías (Wang *et al.*, 2003): a) genes que participan en las cascadas de señalización y en el control transcripcional, tales como MAPK (proteínas kinasas activadas por mitógenos), MYC/MYB (factores transcripcionales) y SOSk (kinasas sensibles al exceso de salinidad) (Abe *et al.*, 1997; Munnik *et al.*, 1999; Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2000; Zhu, 2001b; Yuasa *et al.*, 2001), fosfolipasas (Chapman, 1998; Frank *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2000), y factores transcripcionales como HSF (del inglés “heat shock factor”) y las familias CBF/DREB y ABF/ABAE (Stochinger *et al.*, 1997; Schöffl *et al.*, 1998; Choi *et al.*, 2000; Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2000); b) genes que participan en la protección y estabilización de membranas y proteínas, tales como Hsp (del inglés “heat shock protein”), chaperonas y proteínas LEA (del

inglés “late embryogenesis abundant”) (Vierling, 1991; Ingram y Bartels, 1996; Tomashow, 1998, 1999), osmoprotectores y detoxificadores de radicales libres (Bonhert y Sheveleva, 1998; Apel y Hirt, 2004); c) genes que participan en el flujo y transporte de agua e iones, tales como aquoporinas y transportadores iónicos (Laurel, 1997; Serrano *et al.*, 1999; Tyerman *et al.*, 1999; Zimmermann y Sentenac, 1999; Blumwald, 2000).

Las plantas perciben el estrés salino mediante señales iónicas ( $\text{Na}^+$ ) y osmóticas. El exceso de  $\text{Na}^+$  es percibido por receptores transmembrana y exteriores de la membrana plasmática o mediante enzimas sensibles al  $\text{Na}^+$  (Zhu, 2003). Se ha descrito que el propio “antiporter” SOS puede actuar como sensor de  $\text{Na}^+$  (Zhu, 2003). La entrada de  $\text{Na}^+$  mediante canales iónicos no específicos puede causar una despolarización de la membrana que activa los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ . La activación de estos canales genera oscilaciones en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  y señales de estrés salino (Sanders *et al.*, 1999). El estrés hiperosmótico produce una disminución del volumen celular y pérdida de turgencia que ocasionan la separación de la membrana y pared celular. Varios autores consideran que esta deformación citológica es percibida por canales activados, protein-quinasas, histidin-quinasas y quinasas asociadas a pared celular (Urao *et al.*, 1999; Kreps *et al.*, 2002; Seki *et al.*, 2002). El aumento de los niveles de ABA (Jia *et al.*, 2002; Xiong y Zhu, 2003) y de ROS (Smirnoff, 1993; Hernández *et al.*, 2001; Zhu, 2001a, 2001b, 2002) durante el estrés salino constituyen señales para la regulación de la homeostasis osmótica e iónica (Chinnusamy *et al.*, 2005).

El control sobre la captación de  $\text{K}^+$ , la entrada y salida de  $\text{Na}^+$  y la utilización del  $\text{Na}^+$  para los ajustes osmóticos son estrategias desarrolladas por las plantas para mantener un balance aceptable de  $\text{K}^+ / \text{Na}^+$  (Zhu, 2003) y minimizar la citotoxicidad iónica. La compartimentalización del  $\text{Na}^+$  en vacuolas es una estrategia costosa pero efectiva para el ajuste osmótico del citosol que implica “antiporter”  $\text{Na}^+ / \text{H}^+$ , proton ATPasa (tipo V) y proton pirofosfatasa (Chinnusamy *et al.*, 2005). La biosíntesis y acumulación de solutos compatibles como la prolina, betainas, polialcóholes, azúcares solubles y azúcares alcohólicos (Bohnert y Jensen, 1996; Chen y Murata, 2000) constituyen mecanismos para el control de la homeostasis osmótica. La secreción de  $\text{Na}^+$  es una estrategia utilizada por las plantas halófitas para el control osmótico (Rozema *et al.*, 1981). Los sistemas detoxificadores de ROS y las proteínas de estrés perteneciente a la familia de las LEA contribuyen a prevenir los daños causados por el estrés salino (Zhu, 2002; Verdoy *et al.*, 2004).



En las leguminosas, el estrés salino supone una acentuada disminución de la productividad, especialmente cuando las plantas dependen de la fijación simbiótica para la adquisición de nitrógeno (Tu, 1981; Swaraj y Bishnoi, 1999; Zahran, 1999; Coba de la Peña *et al.*, 2003). Se produce una disminución en el peso de la planta y del contenido de nitrógeno (Cordovilla *et al.*, 1995c). En general, los rizobios son menos sensibles al estrés salino que la planta hospedadora (Swaraj y Bishnoi, 1999). Existen diferencias en la tolerancia a la salinidad entre géneros, especies e incluso cepas de *Rhizobium* (Zahran, 1999). El estrés provoca distorsiones morfológicas por expansión celular (Busse y Bottomley, 1989), disminución en la síntesis de exopolisacaridos (Lloret *et al.*, 1998), variaciones en la longitud de la cadena lateral de los lipopolisacaridos (Zahran, 1991c; Zahran *et al.*, 1994; Lloret *et al.*, 1995; Soussi *et al.*, 2001) y alteraciones en los oligosacaridos de los espacios periplásmicos (Guittoni y Bueno, 1995). La respuesta de las leguminosas frente al estrés salino depende de las condiciones climáticas, las propiedades del suelo y el estado de desarrollo de la planta (Cordovilla *et al.*, 1995a, 1995b, 1995c). Además, existen diferencias en la tolerancia a la salinidad entre géneros, especies e incluso líneas o variedades (Abdel-Wahab y Zahran, 1981; Zahran, 1991a, 1991b; Zhang *et al.*, 1991; Fagg y Stewart, 1994; Cordovilla *et al.*, 1995c). El estrés salino provoca alteraciones morfológicas y estructurales en los nódulos de las leguminosas. Se produce plasmolisis citoplásmica y pérdida de rigidez de la pared celular (James *et al.*, 1993; Pliego, 2000), menor empaquetamiento de la corteza interna (Serraj *et al.*, 1995), aparición de núcleos lobulados y variaciones en el grado de condensación de la cromatina (Werner *et al.*, 1980; Serraj *et al.*, 1995), disminución de los espacios intercelulares (Cachorro *et al.*, 1995) y aumento de la epidermis y de la superficie de la membrana cortical debido al aumento del número de vesículas (Pliego, 2000). Las alteraciones estructurales también se producen en el retículo endoplásmico, microtúbulos, mitocondrias y plastidios (Swaraj y Bishnoi, 1999).

El establecimiento de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa y la fijación biológica del nitrógeno son procesos extremadamente sensibles a la salinidad (Sanchez-Diaz *et al.*, 1982; Singleton y Bohlool, 1983; Delgado *et al.*, 1994; Swaraj y Bishnoi, 1999). El estrés salino inhibe las primeras etapas de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa por lo que la eficiencia de la nodulación se ve drásticamente disminuida (Sprent y Zahran, 1988). Se ha descrito el efecto inhibitorio sobre la nodulación en plantas de *Cicer arietinum* inoculadas y crecidas en condiciones de salinidad con un rizobio tolerante a la salinidad, *Mesorhizobium ciceri* Ch191. Se observó una inhibición parcial, menor



número y peso de nódulos, a  $4 \text{ dS m}^{-1}$  ( $34.2 \text{ mol m}^{-3} \text{ NaCl}$ ), una total inhibición de la nodulación a  $7 \text{ dS m}^{-1}$  ( $61.6 \text{ mol m}^{-3} \text{ NaCl}$ ) y la muerte de la planta a  $8 \text{ dS m}^{-1}$  ( $71.8 \text{ mol m}^{-3} \text{ NaCl}$ ) (Elsheikh y Wood, 1990). Igualmente se ha descrito la reducción en el peso de los nódulos de plantas de *Pisum sativum*, *Vicia faba*, *Glicine max* y *Phaseolus vulgaris* crecidas en condiciones de salinidad (50 y 100 mM NaCl) (Delgado *et al.*, 1994). En general, aparecen un menor número de pelos deformados con la típica curvatura (Tu, 1981; Zahran, 1986; Zahran y Sprent, 1986) y solo el 30 % contiene canales de infección (Zahran y Sprent, 1986). Se han identificado varios genes implicados en la tolerancia al estrés salino que son fundamentales para la nodulación (Nogales *et al.*, 2004). La reducción de la actividad de fijación de nitrógeno depende por una parte de la planta y su estado de desarrollo y por otra de la intensidad, duración y modo de aplicación del estrés salino. La reducción de la fijación de nitrógeno se ha atribuido y correlacionado con la caída de la actividad nitrogenasa (Burns *et al.*, 1985), la reducción en la respiración de los nódulos (Ikeda *et al.*, 1992; Georgiev y Atkins, 1993; Delgado *et al.*, 1993; 1994; Serraj *et al.*, 1994; Walsh, 1995), el aumento del metabolismo fermentativo en los bacteroides (Mazurowa *et al.*, 1991), la caída de la actividad fotosintética (Georgiev y Atkins, 1993; Verdoy *et al.*, 2004), la disminución en los niveles de expresión y actividad de la sacarosa sintasa (Gordon *et al.*, 1997) y la disminución en la síntesis de proteínas citosólicas, especialmente leghemoglobina (Bourgueais-Chaillou *et al.*, 1992; Delgado *et al.*, 1993; 1994; Sheokand *et al.*, 1995). Así mismo, se ha descrito un descenso de la impermeabilidad al oxígeno (Delgado *et al.*, 1994; Serraj *et al.*, 1995; Fernández-Pascual *et al.*, 1996; Lluch y Ocaña, 1997; Swaraj y Bishnoi, 1999; Aydi *et al.*, 2004). No están claros los mecanismos por los que se controla la barrera de difusión al oxígeno en función de las condiciones ambientales. Se ha correlacionado las variaciones ambientales con la elongación celular y la presencia de glicoproteínas en el espacio extracelular de la corteza interna (Hunt y Layzell, 1993; de Lorenzo *et al.*, 1994; Ianetta *et al.*, 1995; Fernández-Pascual *et al.*, 1996) y con la acumulación de agua en los espacios intercelulares de la corteza interna (Wycoff *et al.*, 1998; Weisbach *et al.*, 1999). En el metabolismo oxidativo se produce un descenso de las actividades antioxidantes y un aumento de las especies reactivas de oxígeno (Sheokand *et al.*, 1995; Bishnoi *et al.*, 1997; Comba *et al.*, 1998; Zahran, 1999; Aydi *et al.*, 2004).

El metabolismo carbonado de los nódulos es fundamental en la regulación de la fijación biológica del nitrógeno en los nódulos de las leguminosas. La sacarosa es el

principal producto fotosintético que se transporta vía floema desde las hojas hasta los nódulos u otros sumideros. La sacarosa es catabolizada para producir generalmente ácido málico (Udvardy y Day, 1997). Los bacteroides utilizan los productos del catabolismo de la sacarosa para obtener energía y poder reductor para la fijación del nitrógeno (Vance y Heichel, 1991; Gordon, 1995; Winter *et al.*, 1997). La sacarosa sintasa (SS) actúa degradando la sacarosa en tejidos que poseen elevados niveles y una alta demanda de esqueletos carbonados accesibles (Winter *et al.*, 1997). La UDP-glucosa puede integrarse en la síntesis de polisacaridos de la pared celular y de otros azúcares (Kleczkowski, 1996; Pozueta-Romero *et al.*, 1996). Las hexosas se metabolizan por distintas vías oxidativas, glucólisis o pentosas-fosfato. En la ruta glicolítica, las hexosas son hidrolizadas para dar fosfoenolpiruvato (PEP). La enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPc) cataliza la unión del CO<sub>2</sub> respiratorio con PEP para producir oxalacetato.

Varios autores correlacionan la inhibición de la actividad SS y la disminución de la fijación del nitrógeno como respuesta al estrés salino (Fernandez-Pascual *et al.*, 1996; Gordon *et al.*, 1997). Hay una destacable reducción en los niveles de ARNm de SS en los nódulos de plantas de soja sometidas a estrés salino (Gordon *et al.*, 1997). Igualmente hay una mayor cantidad de sacarosa (Fellows *et al.*, 1987) en los nódulos de plantas de soja sometidas a déficit hídrico. La actividad PEPc se ha asociado con la actividad nitrogenasa (Vance *et al.*, 1985; Lang *et al.*, 1993). La inhibición de la actividad nitrogenasa también afecta a la actividad PEPc (Lang, 1990; Vance y Heychel, 1991). Las variaciones ambientales o situaciones de estrés incrementan la actividad enzimática de PEPc probablemente debido a la síntesis *de novo* (Ju *et al.*, 1997; Foyer *et al.*, 1998; Gouia *et al.*, 2003).

El estudio de los mecanismos moleculares básicos de homeostasis celular iónica, homeostasis osmótica y control de daño y reparación por estrés es fundamental para explotar las posibilidades de diseño e ingeniería genética en la obtención de plantas resistentes o más tolerantes a la salinidad. La obtención de cultivos más tolerantes es actualmente crítica para aumentar la producción mundial de alimentos.

La transformación de plantas para manipular la homeostasis iónica, acumular solutos compatibles y proteínas LEA o potenciar los sistemas detoxificadores son estrategias desarrolladas en numerosos trabajos que han demostrado la potencialidad de la ingeniería genética en la obtención de plantas más tolerantes a la salinidad. Aunque la tolerancia a los estreses ambientales en general y el estrés salino en particular, esta



regulada por multitud de genes y mecanismos, se han descrito numerosos ejemplos de plantas transgénicas sobreexpresando un solo gen que presentan una mayor tolerancia a la salinidad (Chinnusamy *et al.*, 2005).

Tabla 1.2. *Plantas transgénicas con genes del metabolismo oxidativo*

Gen	Proteína	Planta	Tolerancia	Bibliografía
ALR	Aldosa/aldehído reductasa	Tabaco	Sequía y radiación ultravioleta	Hideg <i>et al.</i> , 2003
		Tabaco	Frío y cadmio	Hegedüs <i>et al.</i> , 2004
		Tabaco	Sequía	Oberschall <i>et al.</i> , 2000
ALDH	Aldehído Deshidrogenasa	<i>Arabidopsis</i>	Salinidad, sequia, metales, etc.	Sunkar <i>et al.</i> , 2003
APX	Ascorbato peroxidasa	<i>Arabidopsis</i>	Calor	Shi <i>et al.</i> , 2001
			Metilviológeno	Mugia <i>et al.</i> , 2004
		Algodón	Heladas	Kornyeyev <i>et al.</i> , 2003
		Tabaco	Estrés oxidativo	Wang <i>et al.</i> , 1999
CAT	Catalasa	Arroz	Heladas	Matsmura <i>et al.</i> , 2002
		Tabaco	Estrés oxidativo	Polidoros <i>et al.</i> , 2001
FER	Ferritina	Tabaco	Hierro	Deak <i>et al.</i> , 1999
SOD	Superóxido dismutasa	Alfalfa	Invierno	McKersei <i>et al.</i> , 1999
		Alfalfa	Sequía	Rubio <i>et al.</i> , 2002
		Alfalfa	Heladas	McKersei <i>et al.</i> , 1993
		Alfalfa	Sequía	McKersei <i>et al.</i> , 1996
		Tabaco	Heladas y calor	Gupta <i>et al.</i> , 1993
		Tabaco	Ozono	Van Camp <i>et al.</i> , 1994
		Tabaco	Estrés oxidativo	Bowler <i>et al.</i> , 1991
		Tabaco	Deficiencia de Mn	Yu <i>et al.</i> , 2003
		<i>Brassica</i>	Aluminio	Basu <i>et al.</i> , 2001
		Arroz	Sequia	Wang <i>et al.</i> , 2005
GST	Glutation S-transferasa	<i>Arabidopsis</i>	Salinidad	Wang <i>et al.</i> , 2004
		<i>Arabidopsis</i>	Aluminio	Ezaki <i>et al.</i> , 2000
		Tabaco	Estrés oxidativo	Katsuhara <i>et al.</i> , 2005
GST/GPX	Glutation S-transferasa glutation peroxidasa	Tabaco	Salinidad	Roxas <i>et al.</i> , 2000
GPX	Glutation peroxidasa	Tabaco	Heladas y salinidad	Yoshimura <i>et al.</i> , 2004

En plantas, se ha correlacionado los niveles de ROS y antioxidantes con la tolerancia a estreses ambientales. Se ha descrito cómo plantas transgénicas que sobreexpresan enzimas antioxidantes, antioxidantes no enzimáticos o compuestos que adicionalmente pueden detoxificar ROS (Bowler *et al.*, 1992; Noctor y Foyer, 1998) presentan un incremento en la tolerancia a diferentes estreses (Tabla 1.2).



El proceso de fijación de nitrógeno en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa supone una fuente adicional de ROS. La presencia de compuestos reductores, ácidos grasos polinsaturados, abundante hierro libre, y proteínas lábiles al oxígeno junto con la elevada tasa de respiración de los simbioses suponen un alto riesgo de formación de ROS (Puppo y Halliwell, 1988; Ragland y Theil, 1993; Dalton, 1995; Becana *et al.*, 2000). En leguminosas se ha observado como el estrés salino reduce enormemente la eficiencia de la nodulación y produce un incremento del daño oxidativo y la senescencia prematura de los nódulos (Comba *et al.*, 1998; Zahran, 1999; Swaraj y Bishnoi, 1999; Aydi *et al.*, 2004).

El aumento de los niveles antioxidantes o la potenciación de los sistemas detoxificadores en el nódulo de la leguminosa podría considerarse una estrategia factible para la protección del órgano fijador contra el daño oxidativo. La consecuente alteración positiva del balance oxidativo del nódulo constituiría un mecanismo para aumentar la tolerancia del proceso de fijación biológica de nitrógeno frente a estreses ambientales en general y estrés salino en particular, y/o retrasar o atenuar el proceso de senescencia natural. Dado que la estructura del nódulo contiene bacterias diferenciadas en el interior de la célula vegetal, el aumento de los sistemas de defensa contra el daño oxidativo podrían provenir tanto de la bacteria simbiótica como de la propia planta.

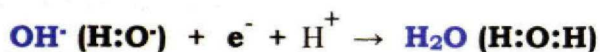
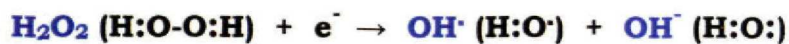
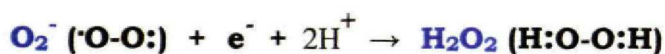
#### 4. El estrés oxidativo

El daño o estrés oxidativo se define como la exposición de la materia viva a diversas fuentes que producen una ruptura del equilibrio que debe existir entre las sustancias o factores oxidantes y los mecanismos antioxidantes encargados de eliminar dichas especies químicas, ya sea por un déficit de estas defensas o por un incremento exagerado de la producción de ROS.

El oxígeno (O) es el elemento más abundante de la corteza terrestre (un 46,7% estimado) y de los océanos (en torno al 87% como componente del agua) y el segundo más abundante en la atmósfera (cerca del 21% en aire seco). La evolución de los organismos fotosintéticos elevó la cantidad del oxígeno molecular (O<sub>2</sub>) en la atmósfera terrestre hasta los niveles actuales. La diferencia entre el oxígeno atómico y el oxígeno molecular estriba en el número de electrones desapareados. El oxígeno atómico es un radical libre con un electrón desapareado en su capa más externa de valencia y el oxígeno molecular es considerado un bi-radical (libre) con los dos electrones

desapareados con “spins” paralelos (estado de triplete). Se trata de un estado poco reactivo con una velocidad de reacción baja a temperatura fisiológica. La activación del oxígeno molecular mediante reacciones químicas y enzimáticas o por efecto de las radiaciones ionizantes genera radicales libres altamente reactivos.

Los organismos aerobios requieren el oxígeno molecular como aceptor final de electrones para la producción eficiente de energía. La reducción tetravalente del oxígeno molecular con producción final de agua es un proceso relativamente inocuo. La primera reducción univalente del oxígeno genera el radical superóxido ( $O_2^-$ ). La adición de un segundo electrón y dos protones genera peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). La tercera reducción univalente genera el radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ) y libera el ión hidróxido ( $OH^-$ ). Finalmente la cuarta reducción univalente junto con la adición de un protón produce la molécula de agua ( $H_2O$ ). Si el oxígeno molecular recibe suficiente energía revierte el paralelismo de los “spins” del estado triplete generando el estado singlete ( $^1O_2$ ). El ambiente reductor del medio celular proporciona abundantes oportunidades para la reducción univalente no enzimática del oxígeno molecular que genera los radicales libres.



El radical superóxido ( $O_2^-$ ) puede actuar como agente reductor u oxidante y tiene una vida media del orden de milisegundos. Puede oxidar sulfuros, ácido ascórbico o NADPH y reducir el citocromo c e iones metálicos. La carga negativa le impide atravesar las membranas celulares (Takahashi y Asada, 1983). El peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) a pesar de ser una especie reactiva de oxígeno, no es un radical ya que tiene apareados todos los electrones de la capa externa de valencia. Su estabilidad y ausencia de carga le permite acumularse y difundir libremente atravesando las membranas celulares (Fisher, 1988). Parte de la toxicidad del peróxido de hidrógeno reside en la facultad de generar el radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ) en presencia de hierro libre a través de la reacción de Fenton (Fenton, 1894; 1899; Haber y Weiss, 1934). El radical hidroxilo



tiene una vida media muy corta pero es el agente oxidante más tóxico y reactivo que se conoce (Halliwell y Gutteridge, 1986). Las especies reactivas de oxígeno son capaces de reaccionar con los principales componentes celulares: lípidos, proteínas y ácidos nucleicos.

La reacción de ROS con los lípidos se conoce como peroxidación de lípidos. Según el modelo clásico incluye tres etapas: iniciación, propagación y terminación, no obstante otros mecanismos han sido propuestos para la peroxidación de lípidos (Niehaus, 1968; Wilson y McDonald, 1986). La peroxidación se inicia con el secuestro de un hidrógeno de la cadena del ácido graso (RH) para generar un radical graso ( $R^{\bullet}$ ) que reaccionará con el oxígeno molecular dando un radical peróxido ( $ROO^{\bullet}$ ). La propagación se desarrolla en base a la reactividad del radical peróxido con otros ácidos grasos para generar más radicales grasos ( $R^{\bullet}$ ) y peróxidos lipídicos ( $ROOH$ ). La terminación tiene lugar con las conjugaciones de los radicales generados ( $R-R$  y  $ROOR$ ). Los conjugados grasos de elevado peso molecular, como el malondialdehído, se acumulan en las membranas peroxidadas. El daño oxidativo de ROS sobre las proteínas provoca modificaciones en los aminoácidos, fragmentaciones de la cadena peptídica, uniones a productos conjugados, alteraciones en las cargas eléctricas e incrementos en la proteólisis. La susceptibilidad de las proteínas depende de la estructura y de la composición aminoacídica (presencia de grupos sulfuro y aromáticos). Las especies reactivas del oxígeno pueden reaccionar con el ADN dado que tanto los azúcares como las bases nitrogenadas son susceptibles de sufrir oxidaciones descontroladas. La reacción de ROS con el ADN ocasiona numerosas lesiones: deleciones de bases, fragmentación de genes, reordenamientos cromosómicos, desmetilación de secuencias, etc.

En las plantas existen numerosas fuentes potenciales para la producción de especies reactivas de oxígeno (Tabla 1.3). Algunas de estas fuentes o reacciones son consecuencia del funcionamiento normal del metabolismo (fotosíntesis y respiración) (Asada y Takahasni, 1987). Otras proceden de rutas metabólicas descontroladas por la incidencia de estreses ambientales (Dat *et al.*, 2000; Jiang y Zhang, 2002; Mithofer *et al.*, 2004). Además, se han descrito nuevas fuentes de producción relacionadas con la muerte celular programa y los mecanismos de defensa frente a patógenos (Hammond-Kosack y Jones, 1996; Orozco-Cardenas y Ryan, 1999; Mitsuhashi, *et al.*, 1999; Grant y Loake, 2000; Vanyushin *et al.*, 2004).



Tabla 1.3. *Producción de ROS en plantas* (modificada de Mittler, 2002)

Mecanismo	ROS	Localización	Bibliografía
Fotosíntesis: ET y PSI / PSII	$O_2^-$	Cloroplastos	Asada, 1999
Respiración: ET	$O_2^-$	Mitocondrias	Maxwell <i>et al.</i> , 1999
Glicolato oxidasa	$H_2O_2$	Peroxisomas	Corpas <i>et al.</i> , 2001
Clorofila excitada	$O_2^1$	Cloroplastos	Asada y Takahashi, 1987
NADPH oxidasa	$O_2^-$	Membrana celular	Grant y Loake, 2000
$\beta$ -Oxidación de lípidos	$H_2O_2$	Peroxisomas	Corpas <i>et al.</i> , 2001
Oxalato oxidasa	$H_2O_2$	Apoplasto	Dat <i>et al.</i> , 2000
Xantina oxidasa	$O_2^-$	Peroxisomas	Corpas <i>et al.</i> , 2001
Peroxidasas ( $Mn^{2+}$ y NADH)	$H_2O_2$ , $O_2^-$	Pared celular	Grant y Loake, 2000
Amina oxidasa	$H_2O_2$	Apoplasto	Allan y Fluhr, 1997

ET, transporte de electrones; PSI, fotosistema I; PSII, fotosistema II.

La producción de ROS se localiza fundamentalmente en cloroplastos (Foyer *et al.*, 1994; Foyer y Noctor, 2000), mitocondrias (Eltner y Oswald, 1994), peroxisomas, glioxisomas, retículo endoplásmico, membrana y pared celular. En los cloroplastos, existen al menos tres sublocalizaciones que pueden ser fuente de especies reactivas de oxígeno: Fotosistema I (PSI), fotosistema II (PSII) y antenas fotorreceptoras de clorofila (Eltner, 1991). En el PSI, la transferencia de electrones en condiciones limitantes de NADP puede derivarse a la reducción monovalente del oxígeno molecular. Se estima que entre el 10 y el 20 % de los electrones que fluyen a través del PSI reducen el oxígeno molecular (Asada, 1999). En el PSII, la transferencia incompleta de los cuatro electrones de la hidrólisis del agua puede excitar la molécula de oxígeno generando ROS (Baker, 1991). La molécula de clorofila excitada cede el electrón al oxígeno en lugar de transferirlo al PSII ante condiciones ambientales adversas (sequía, déficit de nutrientes, contaminantes, herbicidas, etc.) que provocan el cierre de los estomas. La mayoría del oxígeno molecular es consumido en el transporte de electrones de las mitocondrias mediante la reducción tetravalente por la citocromo c oxidasa o por la alternativa oxidasa. En condiciones normales, ninguno de estos procesos genera cantidades significativas de ROS (Rich y Bonner, 1978). Se estima que aproximadamente el 2 % del oxígeno consumido es utilizado para generar peróxido de hidrógeno (Scandalios *et al.*, 1997). La incidencia de determinados estreses ambientales

provoca desestabilizaciones y fluctuaciones en la cadena de transporte de electrones generando ROS (Rich y Bonner, 1978; Turrents *et al.*, 1982).

En los peroxisomas y glioxisomas se localizan enzimas que participan en la  $\beta$ -oxidación de lípidos y en el ciclo del ácido glioxílico. La glicolato oxidasa genera  $H_2O_2$  mediante la transferencia de dos electrones desde el glicolato al oxígeno (Lindqvist *et al.*, 1991). Las actividades xantina oxidasa, urato oxidasa y NADH oxidasa generan el radical superóxido por la reducción de los respectivos substratos. En el retículo endoplásmico tienen lugar varios procesos oxidativos (oxidaciones, hidroxilaciones, dealcalinizaciones, desaminaciones, dehalogenaciones, desaturaciones, etc.). La producción de ROS en la membrana celular se circunscribe a la actividad NAD(P)H oxidasa (Vianello y Macri, 1991; Grant y Loake, 2000). Esta enzima produce el radical superóxido a través de ciclos redox de determinadas quinonas y compuestos nitrogenados (Cakmak y Marschner, 1988).

En la pared celular existe un metabolismo fundamentalmente anabólico. No obstante, también se desarrollan reacciones catabólicas como respuesta a patógenos y frente a compuestos xenobióticos en las que tiene lugar la producción de ROS (Gross *et al.*, 1977; Elstner, 1991; Vianello y Macri, 1991; Grant y Loake, 2000). Algunos autores consideran las especies reactivas de oxígeno moléculas señalizadoras, e interpretan su producción y presencia como señales para las células vegetales en la activación de las respuestas de defensa frente a estreses abióticos y patógenos (Doke *et al.*, 1991; Desikan *et al.*, 2001; Knight y Knight, 2001; Neill *et al.*, 2002; Foyer *et al.*, 2004). Se ha descrito la producción y actuación de ROS como mensajeros secundarios de ácido abscísico (ABA) (Pei *et al.*, 2000) y etileno (Moeder *et al.*, 2002) en respuestas de hipersensibilidad y de resistencia adquirida (Neill *et al.*, 2002). El  $H_2O_2$  actúa como mensajero secundario en las cascadas de señalización de multitud de procesos controlados por hormonas (desarrollo de embriones axiales, formación de raíces laterales, germinación de semillas, apertura de hojas, crecimiento de coleóptilos, etc.) (Joo *et al.*, 2001; Foreman *et al.*, 2003; Kovalchuk *et al.*, 2003). La producción de  $O_2^-$  mediante la NADPH oxidasa localizada en la membrana plasmática regula el crecimiento de los pelos radicales a través de la activación de los canales de calcio (Foreman *et al.*, 2003). La planta reacciona hostilmente ante la invasión de microorganismos, incluso ante aquellos potencialmente beneficiosos. La membrana plasmática contiene receptores de la familia MLO (Piffanelly *et al.*, 2002) que identifican posibles amenazas y desencadenan respuestas apropiadas. La percepción de



alteraciones ambientales provoca un “burst” oxidativo transitorio que puede ir seguido de otro más prolongado provocando la muerte celular (PCD del inglés “programed cell death”) (Hückelhoven *et al.*, 1999; Vanacker *et al.*, 2000; Piffanelly *et al.*, 2002).

En las leguminosas, la fijación biológica de nitrógeno supone una fuente adicional para la producción de especies reactivas de oxígeno. A pesar de las bajas concentraciones de oxígeno molecular (5-60nM) de la zona infectada debido al riguroso control fisiológico, los nódulos tienen una elevada capacidad de producción de ROS (Hunt y Layzell, 1993). La presencia de compuestos reductores, ácidos grasos polinsaturados, hierro libre, y proteínas lábiles al oxígeno junto con la elevada tasa de respiración de los simbiontes suponen un alto riesgo de formación de ROS (Dalton, 1995; Becana *et al.*, 2000). La leghemoglobina ( $Lb^{2+}$ ) constituye probablemente la principal fuente de ROS en el nódulo. Está encargada de transportar el oxígeno ( $Lb^{2+}O_2$ ) a un flujo bajo y constante para prevenir la inactivación de la nitrogenasa (Appleby, 1984). La leghemoglobina puede autooxidarse espontáneamente para dar la forma ferrica ( $Lb^{3+}$ ) y generar el ión superóxido ( $O_2^-$ ) que puede oxidar nuevas moléculas de hemoglobina. La leghemoglobina ( $Lb^{2+}$  y  $Lb^{3+}$ ) también puede reaccionar con el peróxido de hidrógeno para dar formas oxidadas de larga vida ( $Lb^{4+}$ ) o formas inestables (radical Lb). El radical Lb evoluciona hasta moléculas más estables mediante conjugaciones intermoleculares, para dar dímeros, y conjugaciones intramoleculares que forman compuestos verdes. La oxidación mediante el peróxido de hidrógeno puede incluso liberar el hierro catalítico por la degradación del grupo hemo (Puppo y Halliwell, 1988). Los nódulos son extremadamente ricos en hierro dado que es el principal constituyente de la nitrogenasa, ferritina y leghemoglobina (Ragland y Theil, 1993). Cuando se encuentra como hierro libre o en la mayoría de las formas queladas cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno para dar el radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ) a través de la reacción de Fenton (Fenton, 1894; 1899; Haber y Weiss, 1934). Además, en el nódulo existen proteínas lábiles al oxígeno que producen ROS. La dinitrogenasa (molibdoferroproteína), el cofactor FeMo y especialmente la dinitrogenasa reductasa (ferroproteína) sufren una inactivación irreversible por la presencia del oxígeno molecular que conlleva la generación de ROS (Becana *et al.*, 2000). La ferredoxina es el donador de electrones más cercano a la nitrogenasa y puede desviar el flujo de electrones para la reducción monovalente del oxígeno molecular generando el radical superóxido (Becana *et al.*, 2000). Las hidrogenasas son enzimas asociadas a membrana capaces de reciclar total o parcialmente el hidrógeno producido



por la nitrogenasa. Son proteínas sensibles al oxígeno y su inactivación conlleva la producción del radical superóxido y otras formas reactivas del oxígeno (Becana *et al.*, 2000). La producción de ROS en el nódulo puede ser igualmente consecuencia del normal funcionamiento de determinadas enzimas o rutas metabólicas. La xantina oxidasa (EC. 1.1.3.22) y urato oxidasa (EC. 1.7.3.3) son enzimas que participan en el catabolismo de las purinas que producen el radical superóxido y  $H_2O_2$  respectivamente (Becana *et al.*, 2000). La lipoxigenasa (EC. 1.13.11.12) cataliza la oxidación de ácidos grasos polinsaturados mediante el oxígeno molecular produciendo el radical superóxido (Lynch y Thompson, 1984). Se ha descrito la inducción de receptores, homólogos a la familia MLO de plantas (Piffanelly *et al.*, 2002), en nódulos de leguminosas para inhibir los sistemas generadores de ROS (Shaw y Long, 2003) y por tanto prevenir las respuestas de hipersensibilidad frente a los rizobios y abortar los procesos de muerte celular (Colebatch *et al.*, 2004).

#### 4.1. Mecanismos de defensa antioxidante

La elevada toxicidad de las especies reactivas de oxígeno y su función como moléculas señalizadoras requiere diferentes mecanismos reguladores de los niveles intracelulares: mecanismos que modulen los niveles normales de ROS para supuestos de señalización y mecanismos antioxidantes que eliminen o impidan la formación de ROS, especialmente en condiciones de estrés.

La incidencia de determinados estreses ambientales supone un aumento de las tasas de producción de ROS (Mittler, 2002). Se han descrito ciertas adaptaciones o mecanismos que alivian o impiden parte de los efectos causados por estos estreses y provocan un descenso de los niveles de ROS (Tabla 1.4).

Se han observado adaptaciones anatómicas que implican movimientos y retorcimientos foliares, epidermis refractarias y ocultación de los estomas en estructuras especializadas (Mittler *et al.*, 2001). Igualmente se han descrito adaptaciones fisiológicas como los metabolismos  $C_4$  y CAM y mecanismos moleculares de regulación de la fotosíntesis en función de la calidad e intensidad de la luz recibida (Mittler *et al.*, 2001; Mullineaux y Karpiski, 2002). Las alternativas oxidasas (AOXs) son un grupo de enzimas que constituyen una salida alternativa de los electrones transportados en las cadenas respiratorias y fotosintéticas reduciendo el oxígeno molecular a agua (Maxwell *et al.*, 1999; Rizhsky *et al.*, 2002).

Tabla 1.4. *Adaptaciones para impedir la formación de ROS* (Mittler, 2002)

Mecanismo	Especie	Localización principal	Bibliografía
Adaptaciones anatómicas	$O_2^-$ , $H_2O_2$ , $O_2^1$	Epidermis hoja.	Mittler <i>et al.</i> , 2001
Metabolismo C <sub>4</sub> -CAM	$O_2^-$ , $H_2O_2$	Cl., Cit., Vac.	Mittler <i>et al.</i> , 2001
Supresión de fotosíntesis	$O_2^-$ , $H_2O_2$	Cl.	Mullineaux y Karpiski, 2002
Modulación de antenas	$O_2^-$ , $O_2^1$	Cl.	Mittler <i>et al.</i> , 2001
Alternativa oxidasa	$O_2^-$	Cl., Mit.	Rizhsky <i>et al.</i> , 2002
Movimiento de Cl.	$O_2^-$ , $H_2O_2$ , $O_2^1$	Cit.	Mullineaux y Karpiski, 2002

Cit. citosol; Cl. cloroplastos; Mit. mitocondrias; Vac. vacuolas.

Tabla 1.5. *Detoxificación de ROS y radicales libres* (modificada de Mittler, 2002)

Mecanismo	Especie	Localización principal	Bibliografía
Superóxido dismutasa	$O_2^-$	Cl., Mit., Per., Cit., Apo.	Bowler <i>et al.</i> , 1992
Catalasas	$H_2O_2$	Per., Gl.,	Willekens <i>et al.</i> , 1997
Peroxidasas	$H_2O_2$	Cit., PC., Vac.	Asada y Takahashi, 1987
Ascorbato peroxidasa	$H_2O_2$	Cl., Mit., Per., Cit., Apo.	Shigeoka <i>et al.</i> , 2002
Glutation peroxidasa	$H_2O_2$ , ROOH	Cit., Cl.	Dixon <i>et al.</i> , 1998
Ácido ascórbico	$H_2O_2$ , $O_2^-$	Cl., Mit., Per., Cit., Apo.	Nakano y Asada, 1987
Glutation	$H_2O_2$	Cl., Mit., Per., Cit., Apo.	Noctor y Foyer, 1998
$\alpha$ -Tocoferol	ROOH, $O_2^1$	Mb.	Asada y Takahashi, 1987
Carotenoides	$O_2^1$	Cl.	Asada y Takahashi, 1987
Polifenoles	$H_2O_2$ , $R^*$	Cit.	Takahama y Oniki, 1997
Poliaminas	$O_2^1$ , $R^*$	Cit.	Drolet <i>et al.</i> , 1986
Ferritina	Fe libre	Cl.,	Theil, 1987

Apo. apoplasto; Cit. citosol; Cl. cloroplastos; Gl. glioxisomas; Mb. membranas; Mit. mitocondrias; PC. pared celular; Per. peroxisomas; Vac. vacuolas.

Los principales mecanismos de defensa antioxidante se clasifican en antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. Los antioxidantes enzimáticos engloban fundamentalmente a catalasas, superóxido dismutasas, peroxidasas y enzimas de los ciclos antioxidantes (“water-water cycle”, ascorbato-glutation y glutacion peroxidasa) (Tabla 1.5). Los antioxidantes no enzimáticos o estequiométricos, a su vez se dividen en



tres grupos: reductores liposolubles asociados a membranas (tocoferoles, carotenoides, flavonoides, etc.), reductores hidrosolubles (ácido ascórbico, tioles, etc.) y quelantes de metales (ferritina) (Tabla 1.5).

#### 4.1.1. Antioxidantes enzimáticos

##### 4.1.1.1. Superóxido dismutasa

La superóxido dismutasa (SOD) (EC 1.15.1.1) fue inicialmente descrita como una proteína de almacenamiento de cobre (Mann y Keilis, 1938). Su función catalítica fue descubierta por McCord y Fridovitch (1969). Las SODs engloban un grupo de metaloenzimas que catalizan la dismutación del radical superóxido a peróxido de hidrógeno y oxígeno según la siguiente reacción:



Se han descrito tres tipos de SODs en función del cofactor metálico que contienen: hierro (FeSOD), manganeso (MnSOD) y cobre-zinc (CuZnSOD) (Bannister *et al.*, 1987). La comparación de las secuencias aminoácídicas deducidas de los tres tipos de SOD sugiere una posición evolutiva más ancestral de la FeSOD y MnSOD frente a la CuZnSOD. Mientras que las FeSOD y MnSOD probablemente hayan evolucionado de una enzima ancestral común, la CuZnSOD parece haber evolucionado separadamente en eucariotas (Kanematsu y Asada, 1990; Smith y Doolittle, 1992). La razón evolutiva del uso de los diferentes cofactores metálicos probablemente procede de la disponibilidad en la biosfera de los metales requeridos a lo largo de las diferentes eras geológicas (Bannister *et al.*, 1991). Las SODs están presentes en todos los organismos aeróbicos (procariotas y eucariotas) y en la mayoría de los orgánulos subcelulares. Debido a su ubicuidad, muchos autores le confieren un papel central en la defensa frente al daño oxidativo (Beyer, *et al.*, 1991; Bowler *et al.*, 1992; Scandalios, 1993). En las plantas, su secuencia está codificada en el núcleo de la célula y contiene péptidos señal para su redirección a las localizaciones subcelulares.

Las FeSODs se han encontrado en procariotas y en eucariotas. En eucariotas, han sido aisladas en *Euglena gracilis* (Kanematsu y Asada, 1979) y en los cloroplastos y plastidios de los vegetales superiores (Salin, 1988; Bowler *et al.*, 1992). Las FeSODs se inactivan en presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$  pero no se inhiben por el cianuro. Existen dos tipos

diferentes de FeSODs. Hay un primer grupo de enzimas que contienen dos subunidades proteicas (homodímero) y 1-2 átomos de hierro en el centro activo (Alscher *et al.*, 2002). Este tipo de FeSOD ha sido aislado en *Escherichia coli* (Yost y Fridovich, 1973); *Photobacterium sepoa* y *P. leiognathi* (Puget y Michelson, 1974); el anaerobio facultativo *Thiobacillus denitrificans* (Baldensperger, 1978); la bacteria purpúrea *Chromatium vinosum* (Kanetsuma y Asada, 1978) y en diversas plantas (Salin y Bridges, 1980). El segundo grupo de FeSODs contienen cuatro subunidades proteicas (homotetrámero) de 80-90 kDa y 2-4 átomos de hierro en el centro activo (Alscher *et al.*, 2002). Estas FeSODs han sido aisladas en la mayoría de las plantas superiores (Bowler *et al.*, 1992) y en tres procariotas, *Mycobacterium tuberculosis* (Kusunose *et al.*, 1976), *Thermoplasma acidophilum* (Searcy y Searcy, 1981) y *Methanobacterium bryantii* (Kirby *et al.*, 1981).

Las MnSODs se han encontrado en procariotas y en eucariotas. En eucariotas están localizadas en mitocondrias y peroxisomas (del Río *et al.*, 1992; Alscher *et al.*, 2002). La actividad MnSOD no se inhibe en presencia de  $H_2O_2$  o cianuro. Existen MnSODs con dos o cuatro subunidades proteicas con un átomo de manganeso en el centro activo (Alscher *et al.*, 2002). En plantas, se han aislado de mitocondrias de tabaco (Bowler *et al.*, 1994), judía (Reddy y Venkaiah, 1982), sandía (Sandalio y del Río, 1987), claveles (Droillard y Paulin, 1990), espinaca (Jackson *et al.*, 1978), maíz (Zhu y Scandalios, 1993), peroxisomas (del Río *et al.*, 1983) y mitocondrias de guisante (Foster y Edwards, 1980), etc.

Las CuZnSODs se han encontrado fundamentalmente en eucariotas, aunque también se han descrito en algunos procariotas, *Photobacterium leiognathi* (Alscher *et al.*, 2002), *Caulobacter crescentus* (Steinman, 1982) y *Pseudomonas* (Steinman, 1985). En las plantas, existen dos tipos diferentes de CuZnSODs. El primer grupo, contienen dos subunidades con sus respectivos centros activos funcionales, y se localizan en el citoplasma y en el espacio periplásmico (Alscher *et al.*, 2002). El segundo grupo está constituido por cuatro subunidades con sus respectivos centros activos funcionales, y se localiza extracelularmente y en los cloroplastos (Bordo *et al.*, 1994). En plantas, se han aislado del citosol y del cloroplasto de espinaca (Kanetsuma y Asada, 1990) y extracelularmente (Streller *et al.*, 1994; Streller y Wingsle, 1994; Ogawa *et al.*, 1996). También se han aislado de los peroxisomas de sandía (Sandalio y del Río, 1987).

Las tres clases de SOD han sido encontradas en nódulos de leguminosas (Puppo *et al.*, 1982, 1986; Matamoros *et al.*, 2003). No obstante, algunas especies de leguminosas



no presentan las tres clases de SOD. La CuZnSOD se ha descrito como un dímero de 32 kDa con 2 átomos de cobre y 2 de zinc, y se ha localizado en el citosol y en los plastidios de las células del nódulo (Rubio *et al.*, 2004). Los bacteroides poseen una CuZnSOD localizada en el espacio periplásmico (Matamoros *et al.*, 2003). La MnSOD se ha descrito en mitocondrias y en el citoplasma de los bacteroides (Puppo *et al.*, 1986, 1987; Matamoros *et al.*, 2003; Rubio *et al.*, 2004). La MnSOD de la planta es un tetrámero de 82 kDa con 4 átomos de manganeso (Matamoros *et al.*, 2003). La MnSOD del bacteroide es un dímero de 43 kDa con 2 átomos de manganeso (Dimitrijevic *et al.*, 1984). La FeSOD se ha localizado en plastidios y en el citosol como un dímero de 56-58 kDa y 2 átomos de hierro (Puppo *et al.*, 1986; Becana *et al.*, 1989; Moran *et al.*, 2003; Matamoros *et al.*, 2003). Se ha identificado una FeSOD inducible presente en bacterias y bacteroides (Dimitrijevic *et al.*, 1984).

#### 4.1.1.2. Catalasas

La catalasa (CAT) (EC 1.11.1.6) cataliza la dismutación del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno según la siguiente reacción:



Las CATs constan de cuatro subunidades con un grupo hemo ( $\text{Fe}^{3+}$  protoporfirina) unido a su centro activo. Cada subunidad, normalmente contiene una molécula de NAD(P)H unida que ayuda a estabilizar el enzima (Fita y Rossmann, 1985). La actividad CAT se inhibe por la presencia de cianuro, azida o aminotriazol (Havir, 1992).

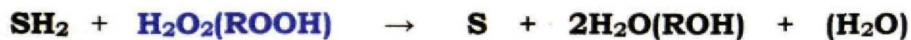
Las CATs están presentes en todos los organismos aeróbicos (procariotas y eucariotas) (Halliwell y Gutteridge, 1989) con algunas excepciones, *Bacillus popilliae* (Yousten *et al.*, 1973), *Mycoplasma pneumoniae* (Low *et al.*, 1968), la alga verde *Euglena* (Graves *et al.*, 1972) y varios parásitos. En las plantas, están presentes en peroxisomas, glioxisomas, y en cualquier compartimento o localización subcelular en el que haya una producción enzimática de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Se han distinguido tres isoformas de CATs: CAT1, CAT2 y CAT3 (Havir y McHale, 1989; Ni y Trelease, 1991; Havir, 1992; Willekens *et al.*, 1994, 1997; Scandalios *et al.*, 1997). Las de clase I se expresan fundamentalmente en hojas y están implicadas en la eliminación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  durante la fotorespiración. Se han aislado en algodón (Ni *et al.*, 1990), *Nicotiana plumbaginifolia*

(Willekens *et al.*, 1994), *Arabidopsis* (Frugoli *et al.*, 1996) y maíz (Scandalios *et al.*, 1997). Las CATs de clase II se expresan en los tejidos vasculares. Se han aislado en *Nicotiana plumbaginifolia* (Willekens *et al.*, 1994), *Ricinus communis* (Suzuki *et al.*, 1995), tomate (Drory y Woodson, 1992), patata (Niebel *et al.*, 1995) y *Arabidopsis* (Frugoli *et al.*, 1996). Las CATs de clase III son muy abundantes en plántulas y semillas y están implicadas en la eliminación de  $H_2O_2$  en los glioxisomas (Willekens *et al.*, 1995). Se han aislado en algodón (Ni *et al.*, 1990), *Nicotiana plumbaginifolia* (Willekens *et al.*, 1994), *Ricinus communis* (Suzuki *et al.*, 1995), maíz (Scandalios *et al.*, 1997) y *Arabidopsis* (Frugoli *et al.*, 1996).

Se ha aislado y purificado CAT de los peroxisomas de los nódulos (Matamoras *et al.*, 2003). La CAT es especialmente abundante en los nódulos determinados para eliminar el peróxido de hidrógeno generado por la ureato oxidasa y otras oxidasas (Kaneko y Newcomb, 1987). Se ha identificado CAT en nódulos de soja como un homotetrámero de 220 kDa (Puppo *et al.*, 1982). Los bacteroides también contienen importantes niveles de esta enzima (Becana *et al.*, 1989). Los bacteroides de *Sinorhizobium meliloti* solo expresan una catalasa (KatA) mientras que las bacterias en vida libre y dentro del canal de infección expresan además otras isoenzimas (KatB y KatC) (Jamet *et al.*, 2003).

#### 4.1.1.3. Peroxidasas

Las peroxidasas engloban a un grupo de enzimas que catalizan la oxidación de componentes celulares mediante el peróxido de hidrógeno, hidroperóxidos orgánicos e hidroperóxidos lipídicos según siguiente reacción:



Las denominadas peroxidasas no específicas o clásicas son aquellas cuya única función es la eliminación del peróxido frente a las denominadas específicas cuyo producto oxidado (S) tiene una función fisiológica definida. La mayoría de las peroxidasas contienen un grupo prostético de naturaleza ferriporfirínica en su sitio activo. Las peroxidasas no específicas se clasifican en función del sustrato donador de electrones: ascorbato peroxidasa (APX, EC 1.11.1.11; ver 4.1.1.4), glutatión peroxidasa (GPX, EC. 1.11.1.9; ver 4.1.1.5), NAD(P)H peroxidasas (EC 1.11.1.2), citocromo c peroxidasa (EC 1.11.1.5) y guaicol peroxidasa (GP, EC 1.11.1.7).



Las GP utilizan compuestos fenólicos como sustratos y están implicadas en multitud de procesos: lignificación, suberización, defensa frente a patógenos, tolerancia a la salinidad y al estrés oxidativo (Matamoros *et al.*, 2003). Varias guaiacol peroxididasas han sido descritas en nódulos de leguminosas aunque su función y localización subcelular no está bien definida (Becana *et al.*, 1989; Iturbe-Ormaetxe *et al.*, 2001; Matamoros *et al.*, 2003). Se ha estudiado sus variaciones en plantas de alfalfa sometidas a déficit hídrico (Rubio *et al.*, 2002) y en plantas de judía en condiciones de salinidad (Jebara *et al.*, 2005).

#### 4.1.1.4. Enzimas del ciclo ascorbato-glutation

El ciclo ascorbato-glutation consiste en una serie de reacciones de óxido-reducción acopladas en las que intervienen cuatro enzimas: APX, monodehidroascorbato reductasa (MDHAR, EC 1.6.5.4), dehidroascorbato reductasa (DHAR, EC 1.8.5.1) y glutatión reductasa (GR, EC 1.6.4.2); y dos sustratos reductores: ascorbato (AsA) y glutatión (GSH).

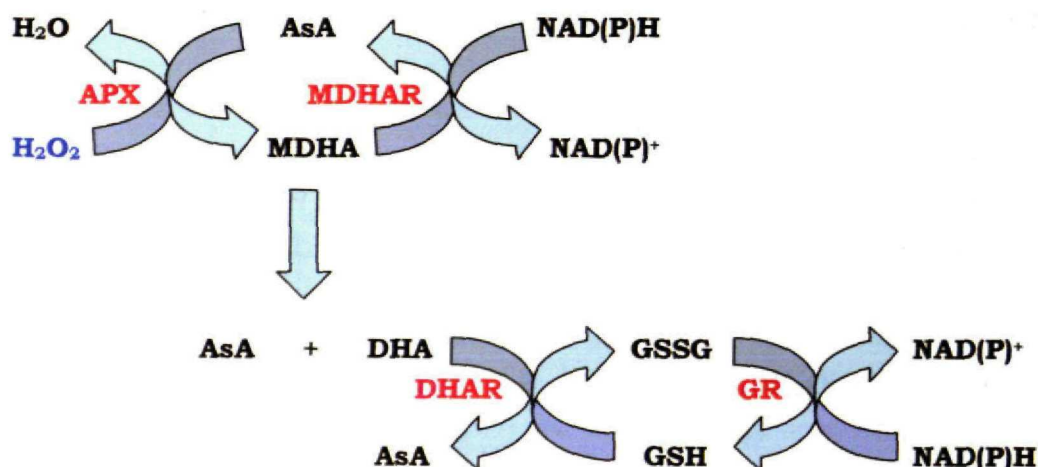


Figura 1.2. *Ciclo ascorbato-glutation*. AsA, ascorbato; APX, AsA peroxidasa; DHA, dehidroascorbato; DHAR, DHA reductactasa; GSH, glutatión reducido; GSSG, glutatión oxidado; GR, GSH reductasa; MDHA, monodehidroascorbato; MDHAR, MDHA reductasa.

La APX utiliza dos moléculas de ascorbato (AsA) para la reducción del  $H_2O_2$  a  $H_2O$ , con la consiguiente formación de dos moléculas de monodehidroascorbato (MDHA) (Figura 1.2). En la célula, el MDHA puede reducirse a AsA mediante la

MDHAR. La MDHAR puede utilizar como poder reductor citocromo B (Horemans *et al.*, 1994), ferredoxina reducida (Miyake y Asada, 1992) o NAD(P)H (Asada, 1992). El radical MDHA tiene una vida media relativamente corta. Si no es reducido por la MDHAR, la molécula se escinde espontáneamente en dehidroascorbato (DHA) y AsA (Figura 1.2). A pesar de la actividad MDHA, existe una cierta producción de DHA. El DHA es reducido a AsA mediante la DHAR utilizando como sustrato el glutatión reducido (GSH) (Foyer y Halliwell, 1976). El glutatión oxidado (GSSG) producido en la reducción del DHA es reducido a GSH mediante GR, utilizando NADPH como poder reductor. La eliminación del  $H_2O_2$  mediante estas series de reacciones acopladas se conoce como ciclo del ascorbato-glutatión.

La actividad APX ha sido identificada en muchos vegetales superiores y comprende una familia de isoenzimas que presentan diferentes características (Shigeoka *et al.*, 2002). Las isoenzimas de APX están distribuidas en al menos seis compartimentos celulares distintos: en el estroma (sAPX) (Chen y Asada, 1989; Ishikawa *et al.*, 1996a), unidas a la membrana tilacoidal (tAPX) (Chen y Asada, 1989; Miyake *et al.*, 1993; Yamaguchi *et al.*, 1996; Ishikawa *et al.*, 1996a), en el lumen tilacoidal (lAPX) (Kieselbach *et al.*, 2000), unidas a las membranas de microcuerpos (peroxisomas y glioxisomas, mAPX) (Yamaguchi *et al.*, 1995a, 1995b; Bunkelmann y Trelease, 1996; Ishikawa *et al.*, 1998), en el citosol (cAPX) (Ishikawa *et al.*, 1996b) y unidas a la membrana mitocondrial (mitAPX) (Jiménez *et al.*, 1997; Leonardis *et al.*, 2000). Las isoenzimas de APX tienen una elevada especificidad por el AsA como fuente de electrones. Además, se ha descrito algunas isoenzimas que pueden utilizar compuestos como el pyrogallol o el guaicol como donadores de electrones (Chen y Asada, 1989; Ishikawa *et al.*, 1995).

La enzima MDHAR tiene un grupo flavín adenín dinucleótido (FAD) como coenzima (Hossain y Asada, 1985). Es capaz de utilizar radicales orgánicos como sustrato para la reducción del MDHA. La actividad MDHAR se ha descrito en varios compartimentos celulares: cloroplastos (Hossain *et al.*, 1984), citosol y mitocondrias (Dalton *et al.*, 1993a; Jiménez *et al.*, 1997; Mittova *et al.*, 2003), glioxisomas (Blowditch y Donaldson, 1990) y peroxisomas (Jiménez *et al.*, 1997; López-Huertas *et al.*, 1999; Mittova *et al.*, 2003).

Se han descrito actividades DHAR en hojas de espinacas (Hossain y Asada, 1984; Shimaoka *et al.*, 2003), tubérculos de patata (Dipierro y Borraccino, 1991), arroz (Kato *et al.*, 1997), *Arabidopsis* (Chew *et al.*, 2003) y *Vigna radiata* (Hou *et al.*, 2000).



Existen discrepancias acerca de las mediciones de DHA y DHAR, la existencia de isoenzimas y su posible localización subcelular (Morrel *et al.*, 1998; Foyer y Mullineaux, 1998). Además, se ha descrito una serie de proteínas con actividad DHAR, tales como tioltransferasa y disulfito isomerasa (Wells *et al.*, 1990; Morrel *et al.*, 1997).

La GR está ampliamente distribuida en procariotas y eucariotas y ha sido estudiada en multitud de ellos. En plantas, se han purificado en guisante (Edwards *et al.*, 1990; Connell y Mullet, 1986; Biewlaski y Joy, 1986), maíz (Mahan y Burke, 1987), *Picea rubens* (Hausladen y Alscher, 1994), espinaca (Halliwell y Foyer, 1978), pino (Wingsle, 1989; Anderson *et al.*, 1990) y *Arabidopsis thaliana* (Kubo *et al.*, 1993). La actividad GR ha sido localizada fundamentalmente en los plastidios aunque también se han descrito isoformas en el citosol y mitocondrias (Creissen *et al.*, 1996). En guisante, los cálculos basados en las actividades suponen una distribución del 70% en cloroplastos, 3% en mitocondrias y 27% en el citosol (Edwards *et al.*, 1990). En plantas, la incidencia de determinados estreses ambientales supone un incremento en la actividad GR (Creissen *et al.*, 1996).

Casi todos los componentes del ciclo ascorbato-glutation han sido descritos en los nódulos de las leguminosas (Dalton *et al.*, 1986, 1992; Dalton, 1995; Iturbe-Ormaetxe *et al.*, 2001). La APX del nódulo de soja ha sido identificada y estudiada en detalle (Jones *et al.*, 1998). La APX se ha localizado principalmente en el citosol (0,9 % de proteína total) y algunas isoformas unidas a membrana en mitocondrias y probablemente peroxisomas (Dalton *et al.*, 1993a; Iturbe-Ormaetxe *et al.*, 2001; Matamoros *et al.*, 2003). En nódulos de leguminosas, se han descrito dos isoformas de MDHAR localizadas principalmente asociadas a la pared celular, en las mitocondrias y posiblemente en peroxisomas y unidas a la membrana celular (Matamoros *et al.*, 2003). La enzima DHAR se ha localizado en el citosol y mitocondrias de las células del nódulo (Dalton *et al.*, 1993a; Iturbe-Ormaetxe *et al.*, 2001). La GR se ha encontrado en el citosol, en las mitocondrias y en los bacteroides (Matamoros *et al.*, 2003). Una posible GR ha sido aislada de los plastidios de los nódulos (Tang y Webb, 1994) al igual que ocurre en los plastidios de las células de raíz (Bielawski y Joy, 1986).

Algunos autores coinciden en la importancia del ciclo ascorbato-glutation para el mantenimiento de la actividad fijadora de nitrógeno. La efectividad de la simbiosis se ha correlacionado con todos los componentes del ciclo (Dalton *et al.*, 1993b, 1998; Dalton, 1995). La APX es la enzima clave del ciclo. Los niveles de ARNm, proteína y actividad APX son muy elevados en los nódulos, principalmente en las células infectadas y del

parénquima (Matamoros *et al.*, 2003). La actividad de APX, MDHAR, DHAR y GR es mucho más alta en nódulos que en raíces no infectadas (2-36 veces) o en nódulos no efectivos (1,5-5,5 veces) (Matamoros *et al.*, 2003).

#### 4.1.1.5. Ciclo glutathion peroxidasa

El ciclo glutathion peroxidasa incluye dos reacciones de óxido-reducción acopladas en las que intervienen dos enzimas: GPX y GR (Figura 1.3). La GPX utiliza los electrones del GSH para la reducción del  $\text{H}_2\text{O}_2$  en  $\text{H}_2\text{O}$ . La GR cataliza la renovación del GSH mediante la reducción del glutathion oxidado (GSSG) utilizando NADPH como poder reductor.

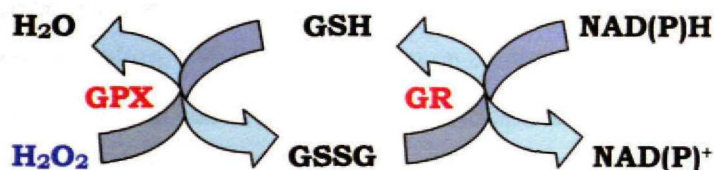


Figura 1.3. **Ciclo glutathion peroxidasa.** GSH, glutathion reducido; GSSG, glutathion oxidado; GPX, GSH peroxidasa; GR, GSH reductasa.

La GPX pertenece a las peroxidases clásicas, cuya única función es la eliminación del peróxido. Inicialmente se les consideró específicas de animales y bacterias pero actualmente está aceptada su presencia en plantas (Dixon *et al.*, 1998; Mittler, 2002). En general se ha descrito su presencia en plastidios, aunque también se han descrito isoformas en el citosol y en los peroxisomas de cebada (Churin *et al.*, 1999). Se han aislado varios clones de ADNc que se expresan en nódulos de *Lotus japonicus* y se localizan en el citosol y plastidios (Matamoros *et al.*, 2003).

#### 4.1.2. Antioxidantes no enzimáticos

##### 4.1.2.1 Ácido Ascórbico

El AsA o vitamina C puede sintetizarse en todas las plantas y animales, excepto en primates y en algunas especies de cerdos. En plantas es el sustrato reductor más importante para la detoxificación del  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Nakano y Asada, 1987; Melhorn *et al.*,



1996). El AsA tiene un potencial redox ( $E^{\circ}$ ) de -0,058 V a pH 7 y es capaz de reaccionar con  $O_2^{\cdot 1}$ , radicales  $\cdot OH$ , radical  $O_2^{\cdot -}$  y con el  $H_2O_2$  (Buettner y Jurkiewicz, 1996). Además de su participación en el ciclo del ascorbato-glutation, el AsA es un importante antioxidante secundario que reduce las formas oxidadas del  $\alpha$ -tocoferol (para revisión ver Munné-Bosch y Alegre, 2002). El AsA participa también en la estabilización y mantenimiento de las actividades de las enzimas que contienen iones metálicos en sus grupos prostéticos (Padh, 1990). El AsA puede acumularse en las plantas hasta concentraciones del orden milimolar en tejidos fotosintéticos y no fotosintéticos (Foyer *et al.*, 1983).

Algunos autores sugieren que tanto el AsA como el MDHA y el DHA están involucrados en la elongación celular, formación de vacuolas y expansión de la pared celular (de Gara *et al.*, 1991; Lin y Varner, 1991; Arrigoni, 1994; Takanama y Oniki, 1994; González-Reyes *et al.*, 1994; Navas y Gómez-Díaz, 1995; Cordoba-Pedregosa *et al.*, 1996; Nemoto *et al.*, 1996).

El AsA se ha encontrado en los nódulos de las leguminosas en unas concentraciones del orden de 1-2 mM (Dalton *et al.*, 1986; Gogorcena *et al.*, 1997; Matamoros *et al.*, 1999; Hernández-Jiménez *et al.*, 2002). Su presencia se ha correlacionado positivamente con la funcionalidad y efectividad de los nódulos (Dalton *et al.*, 1993b). Se ha descrito cómo la inyección directa de ascórbico en el tallo de plantas de soja conduce a un aumento de los niveles de leghemoglobina, un incremento (hasta 4 veces) en la tasa de fijación y un retraso sustancial en la senescencia de los nódulos (Bashor y Dalton, 1999).

#### 4.1.2.2 Glutation

Se ha descrito al glutatión como un importante antioxidante en bacterias, plantas y animales (Foyer y Halliwell, 1976; Meister, 1994). La forma reducida del glutatión, GSH, es un tripeptido ( $\gamma$ -glu-cys-gly,  $\gamma$ -glutamilcisteinilglicina) que se encuentra en balance con la forma oxidada (GSSG). En las plantas existen otros tioles tripeptídicos homólogos donde la glicina es reemplazada por alanina, homoglutation ( $\gamma$ -glu-cys-ala,  $\gamma$ -glutamilcisteinilalanina), por serina, hidroximetilglutation ( $\gamma$ -glu-cys-ser,  $\gamma$ -glutamilcisteinilserina), o por glutamina ( $\gamma$ -glu-cys-ser,  $\gamma$ -glutamilcisteinilglutamina). Las formas oxidadas de estos homólogos pueden ser reducidas por la GR por lo que se les presupone un papel fisiológico y bioquímico similar al GSH (Noctor y Foyer, 1998).

La ruta de biosíntesis del GSH es común para todos los organismos e implica la participación secuencial de dos enzimas:  $\gamma$ -glutamilcisteína sintetasa ( $\gamma$ -ECS, EC 6.3.2.2) y glutathion sintetasa (GSHS, EC 6.3.2.3). En las hojas de las plantas, se han localizado GSHS y  $\gamma$ -ECS en el citosol y plastidios de las células (Noctor y Foyer, 1998).

En plantas además de las propiedades antioxidantes para el control del estado redox de la célula (Noctor y Foyer, 1998), el GSH tiene otras funciones: regula la entrada de compuestos de azufre a nivel radicular (Herschbach y Rennenberg, 1994), sirve como precursor de fitoquelatinas (Grill *et al.*, 1989), es utilizado por la glutathion transferasa (EC 2.1.5.8) para la detoxificación de xenobioticos (Marrs, 1996) y participa en el control redox del ciclo celular (Sánchez-Fernández *et al.*, 1997).

El GSH ha sido descrito en los nódulos de leguminosas como un antioxidante versátil que participa en el ciclo ascorbato-glutathion y que es capaz de detoxificar directamente ROS (Dalton, 1995). Se encuentra en concentraciones del orden de 0,5-1,5 mM (Matamoros *et al.*, 2003). En algunas leguminosas, el homoglutathion (hGSH) sustituye total o parcialmente al glutathion. El hGSH es mayor en *Glicine max*, *Phaseolus vulgaris* y *Vigna radiata*, mientras que el GSH es predominante en *Pisum sativum*, *Medicago sativa* y *Vigna unguiculata* (Matamoros *et al.*, 2003). Se han aislado clones de  $\gamma$ -ECS, GSHS y homoglutathion sintetasa (hGSHS, EC 6.3.2.23) en nódulos de *Lotus japonicus* y *Medicago truncatula* (Frendo *et al.*, 2001). En *Medicago truncatula* hGSHS se expresa en raíces y nódulos y GSHS en hojas (Frendo *et al.*, 2001). En *Lotus japonicus* hGSHS se expresa en raíces y hojas y GSHS en nódulos (Matamoros *et al.*, 2003). Se ha descrito la importancia del GSH y hGSH durante el proceso de nodulación en *Medicago truncatula* dado que, deficiencias en los niveles de GSH y hGSH producen la inhibición de la formación de nódulos (Frendo *et al.*, 2005).

Los bacteroides contienen igualmente elevadas concentraciones de GSH sintetizado por sus propias  $\gamma$ -ECS y GSHS (Moran *et al.*, 2000). No tienen hGSHS pero en los bacteroides se encuentran concentraciones significativas de hGSH procedente de la célula infectada del nódulo (Moran *et al.*, 2000). Se ha descrito un mutante de *Rhizobium tropici* deficiente en GSHS que es más sensible a las alteraciones ambientales pero que es capaz de formar nódulos efectivos en ausencia de competencia de otros rizobios salvajes (Ricciollo *et al.*, 2000).



#### 4.1.2.3 Tocoferoles

Los tocoferoles, y más específicamente el  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), han sido extensamente estudiados por sus propiedades antioxidantes y estabilizadoras de membranas (Diplock *et al.*, 1989). La biosíntesis de tocoferoles ha sido descrita únicamente en plantas, algas y algunas cianobacterias (Munné-Bosch, 2005). Debido a su naturaleza hidrofóbica se localiza en membranas orientando el anillo de benzoquinona con los grupos carbonilo de los fosfolípidos y asociando su cadena con los ácidos grasos en la región interior de la bicapa lipídica. Se localiza específicamente en plastidios y membranas tilacoidales. Los tocoferoles contribuyen al equilibrio del balance redox del cloroplasto y al mantenimiento de la estructura y funcionamiento de la membrana tilacoidal durante el desarrollo normal de la planta y ante la incidencia de estreses ambientales (Munné-Bosch y Alegre, 2002; Sattler *et al.*, 2004). El  $\alpha$ -tocoferol en cooperación con otros antioxidantes participa en la detoxificación de ROS, principalmente oxígeno singlete ( $^1\text{O}_2$ ) y radical hidroxilo ( $^{\bullet}\text{OH}$ ), en las membranas fotosintéticas. El  $\alpha$ -tocoferol puede desactivar físicamente el  $^1\text{O}_2$  mediante transferencia energética por resonancia (Fahrenholz *et al.*, 1974). Además, el  $\alpha$ -tocoferol puede detoxificar químicamente el  $^1\text{O}_2$  generando quinonas y epóxidos de tocoferol. Los  $\alpha$ -tocoferoles reducen los radicales grasos ( $\text{R}^{\bullet}$ ) a los correspondientes peróxidos lipídicos ( $\text{ROOH}$ ) limitando así la propagación de la peroxidación de lípidos de membrana. En la detoxificación de  $\text{R}^{\bullet}$  se genera el radical tocoferoxilo que puede ser reciclado por el ascorbato (para revisión ver Munné-Bosch y Alegre, 2002).

Los niveles de  $\alpha$ -tocoferol varían significativamente durante el crecimiento y desarrollo de la planta (Kruk *et al.*, 2000; Kruk y Strzalka, 2001; Krieger-Liszkay, 2005) y como respuesta a la incidencia de estreses ambientales (Yamauchi y Matsushita, 1979; Munné-Bosch y Alegre, 2003; Hernández *et al.*, 2004). Estas diferencias, son resultado de las variaciones de expresión y actividad de las enzimas implicadas en su síntesis, degradación y reciclado (Munné-Bosch, 2005). La variación de los niveles de  $\alpha$ -tocoferol en plantas sometidas a estrés presenta dos fases bien definidas: una primera fase donde hay un aumento de los niveles debido a la potenciación de su síntesis, y una segunda fase en la que hay un descenso de los niveles debido a que la degradación es superior a la síntesis y reciclado (Munné-Bosch, 2005). En condiciones de estrés su síntesis está regulada por hormonas relacionadas con el estrés: ácido jasmónico (Falk *et al.*, Sandorf y Holländer-Czytko, 2002), ácido salicílico

(Munné-Bosch y Peñuelas, 2003), ácido abscísico (Munné-Bosch, 2005). El descenso de los niveles del antioxidante durante el estrés, procede fundamentalmente de la imposibilidad del reciclado del radical tocoferoxilo por el ácido ascórbico (Munné-Bosch y Alegre, 2002). No hay una reducción significativa de los niveles debida a la desactivación física del  $^1\text{O}_2$  mediante transferencia energética por resonancia.

En leguminosas se ha descrito la presencia de  $\alpha$ -tocoferol en nódulos jóvenes y senescentes ( $15 \mu\text{g g}^{-1}$ ) (Evans *et al.*, 1999). Este antioxidante podría suponer una protección a las membranas celulares del nódulo frente a la peroxidación de lípidos (Becana *et al.*, 2000; Matamoros *et al.*, 2003).

#### 4.1.2.4. Polifenoles

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios (flavonoides, taninos, lignina, etc.) abundantes en los tejidos vegetales (Grace y Logan, 2000). Los polifenoles poseen una estructura química ideal para la detoxificación de radicales libres (Blokhina *et al.*, 2002) y una alta reactividad como donadores de protones y electrones. Los polifenoles tienen especial habilidad en la estabilización de moléculas con electrones desapareados y como quelantes de iones metálicos (Rice-Evans *et al.*, 1997). Los flavonoides pueden alterar el ordenamiento de los lípidos en las membranas reduciendo su fluidez y por tanto alterando la cinética de la peroxidación de lípidos (Arora *et al.*, 2000). Se ha descrito en plantas la participación de los compuestos fenólicos en las cascadas detoxificadoras del peróxido de hidrógeno (Takahama y Oniki, 1997). Los flavonoides y otros compuestos fenólicos son abundantes en el nódulo de las leguminosas (0,4-4 mM) (Matamoros *et al.*, 2003). Además de participar como señales químicas en el establecimiento de la simbiosis, pueden inhibir la peroxidación de lípidos. Los flavonoides estabilizan los radicales grasos ( $\text{R}^\bullet$ ) de las membranas de los nódulos (Moran *et al.*, 1997).

#### 4.1.2.5. Carotenoides

Los carotenoides son compuestos isoprenoides (40C) localizados en los plastidios de los tejidos fotosintéticos y no fotosintéticos de las plantas. Los carotenoides actúan en el cloroplasto como pigmentos accesorios en la absorción de luz (420-500 nm). No obstante, algunos autores sugieren que su principal función es la



detoxificación de varias especies reactivas del oxígeno y de las clorofilas excitadas como consecuencia de la excitación de los fotosistemas por la luz (Young, 1991a). También se le han atribuido funciones estabilizadoras de las membranas de los plastidios (Havaux, 1998; Munné-Bosch y Alegre, 2002, 2003). Existen dos clases de carotenoides: los carotenos que son hidrocarburos (p.ej.  $\beta$ -caroteno) y las xantófilas que son carotenos derivados que contienen uno o más átomos de oxígeno (p.ej. zeaxantina). Su síntesis se localiza en los plastidios dentro de la ruta isoprenoide y sus principales precursores son las clorofilas y los tocoferoles (Young, 1991b). Los carotenoides pueden reaccionar con los radicales grasos ( $R^{\bullet}$ ) procedentes de la peroxidación de lípidos (Burton e Ingold, 1984), detoxificar el estado singlete del oxígeno ( $^1O_2$ ) disipando su energía en forma de calor (Mathis y Kleo, 1973), reaccionar con las clorofilas excitadas para impedir la formación de  $^1O_2$  (Young, 1991a) y eliminar el exceso de energía de los fotosistemas a través del ciclo de las xantofilas (Young, 1991a). No existen datos sobre la presencia y función antioxidante de estos compuestos en los nódulos de las leguminosas.

#### 4.1.2.6. Poliaminas

Las poliaminas son policationes orgánicos que participan como reguladores en el crecimiento, desarrollo y senescencia de la plantas (putrescina, espermina y espermidina) (Walden *et al.*, 1997). Se ha visto que la adición de poliaminas inhibe o retrasa la senescencia en hojas (Galston y Kaur-Sawhney, 1990; Ghost, 1999). Las poliaminas pueden detoxificar radicales libres e inhibir la peroxidación de lípidos (Drolet *et al.*, 1986). El papel de las poliaminas en el establecimiento y desarrollo del nódulo ha sido estudiado en varias leguminosas (Chatterjee *et al.*, 1983; Fujihara *et al.*, 1986; Lahiri *et al.*, 1992) y sus niveles son más altos (5-10 veces) que en otros órganos (Fujihara *et al.*, 2004). Se ha correlacionado los niveles de poliaminas libres y putrescina con el proceso de senescencia de nódulos (Lahiri *et al.*, 2004).

#### 4.1.2.7. Ferritina

Gran parte del potencial tóxico de algunas especies reactivas de oxígeno como  $O_2^-$  y  $H_2O_2$ , proviene de su conversión dependiente de hierro a  $^{\bullet}OH$ . El hierro también

facilita la descomposición de hidroperóxidos lipídicos en radicales tóxicos (alcoxilo y peroxilo).

Se ha considerado a la ferritina como una proteína antioxidante debido a su capacidad para secuestrar y almacenar hasta 4500 átomos de hierro libre por molécula y con ello prevenir el daño oxidativo dependiente de hierro. Se trata de una estrategia ampliamente distribuida desde las bacterias a los mamíferos (Theil, 1987; Proudhon *et al.*, 1996). En plantas, al igual que en bacterias o animales, la ferritina está compuesta de múltiples subunidades. Estas subunidades están codificadas en el núcleo y presentan un péptido señal que dirige la proteína al cloroplasto (Ragland *et al.*, 1990). La presencia de ferritina se ha descrito en varios órganos de la planta (para revisión ver Theil, 1987) incluidos los nódulos fijadores de nitrógeno (Ko *et al.*, 1985, 1987). Bajo condiciones óptimas de crecimiento, los niveles de ferritina son bajos en los órganos vegetativos y durante la maduración de los embriones se acumulan en las semillas (ARNm y proteína) (Lobréaux y Briat, 1991). La síntesis de ferritina está controlada transcripcionalmente en la respuesta al hierro (Briat *et al.*, 1999) y sus rutas de regulación están influenciadas por ABA (Lobréaux *et al.*, 1993). Se ha descrito la estimulación de la síntesis de ferritina durante el daño oxidativo impuesto a células animales y humanas (Balla *et al.*, 1992; Vile y Tyrrell, 1993; Cairo *et al.*, 1995).

En los nódulos, debido a la gran cantidad de hemoproteínas sintetizadas en el citosol de la célula vegetal y a la síntesis de citocromos, ferredoxinas y nitrogenasa en los bacteroides, el almacenamiento controlado del hierro adquiere una vital importancia. Se ha estudiado la correlación entre la ferritina y la eficiencia del nódulo de soja (Ko *et al.*, 1987), su localización en los nódulos de soja, alfalfa y lupino (Ragland y Theil, 1993; Lucas *et al.*, 1998) y judía (Matamoros *et al.*, 1999) y la regulación postranscripcional de la ferritina durante el desarrollo del nódulo de soja (Kimata y Theil, 1994). Se ha descrito la acumulación de ferritina en nódulos senescentes (Lucas *et al.*, 1998, Hernández-Jiménez *et al.*, 2002).

## 5. Flavodoxina

Las flavodoxinas son flavoproteínas de pequeño tamaño y carácter ácido que transfieren electrones a bajo potencial y cuyo único centro redox es un grupo flavinmononucleótido (FMN) unido de forma no covalente. Las flavodoxinas han sido muy estudiadas dado que constituyen un modelo muy sencillo para los estudios



bioquímicos de las flavoproteínas. Estas proteínas tienen la característica única de mediar entre procesos donde se acoplan donadores/aceptores de un solo electrón con aquellos de dos electrones (Gómez-Moreno *et al.*, 1998). Los procesos de transferencia de electrones donde intervienen las flavoproteínas son responsables del mantenimiento de muchas funciones vitales. Las flavodoxinas transfieren electrones en una gran variedad de procesos metabólicos microbianos incluidos entre otros, la fijación biológica del nitrógeno y la fijación del dióxido de carbono (Simondsen y Tollin, 1980). En una bacteria modelo como *Escherichia coli*, la flavodoxina es requerida como reductoras en la activación de la síntesis de metionina dependiente de cobalamina (Osborne *et al.*, 1991), para la síntesis de biotina (Sanyal *et al.*, 1996), para la síntesis de isoprenoides (Puan *et al.*, 2005) y para las activaciones de la ribonucleosido trifosfato reductasa (Bianchi *et al.*, 1993a, 1993b) y piruvato-formato liasa (Sawers y Watson, 1998). En bacterias fijadoras de nitrógeno, la flavodoxina actúa como donador de electrones para el complejo de la nitrogenasa (Deistung y Thorneley, 1986).

En 1966 Knight *et al.*, purificaron a partir de *Clostridium pasteurianum* una proteína de funciones similares a la ferredoxina por lo que propusieron el nombre de flavodoxina. Las flavodoxinas han sido aisladas o identificadas en muchos microorganismos, *Klebsiella* (Drumond *et al.*, 1985), *Azotobacter* (Klugkist *et al.*, 1986a), *Anacystis* (Laudenbach *et al.*, 1988), *Anabaena* (Leonhardt y Straus, 1989; Fillat *et al.*, 1991), *Rhodobacter* (Jouanneau *et al.*, 1990), *Desulfovibrio* (Helms *et al.*, 1990; Helms y Swenson, 1991; Helms y Swenson, 1992), *Escherichia* (Osborne *et al.*, 1991), *Clostridium* (Tanaka *et al.*, 1971; Tanaka *et al.*, 1974; Santangelo *et al.*, 1991), *Megasphaera* (Tanaka *et al.*, 1971). Normalmente, los genes se localizan agrupados en operones junto a otros genes que codifican para proteínas que participan en el transporte de electrones al complejo nitrogenasa. Su expresión puede ser constitutiva (Klugkist *et al.*, 1986a), inducible (Drummond, 1985) o reprimible (Shah *et al.*, 1983; Klugkist *et al.*, 1986b). En algunos microorganismos la síntesis de flavodoxina está asociada a situaciones carenciales de hierro en el medio de crecimiento (p.ej. *Clostridium pasteurianum*) y en otros casos, la síntesis es independiente del hierro (p.ej. *Escherichia coli*).

La cadena polipeptídica tiene una longitud que oscila de 120-220 residuos, lo que equivale a un peso molecular de la apoproteína de 14.500 a 23.000. Estructuralmente existen dos tipos: flavodoxinas cortas (14.500-17.000) y largas (20.000-23.000). Las últimas contienen un lazo o bucle extra de función desconocida (Maldonado *et al.*,

1998). La unión del cofactor ocurre en primer lugar a través de la combinación de puentes de hidrógeno e interacciones aromáticas con la apoproteína. La interacción implica dos residuos aromáticos ubicados a ambos lados del anillo de isoaloxazina. El sitio activo del grupo FMN es el propio anillo de isoaloxazina y puede presentarse en tres estados redox diferentes: quinona ( $\text{Fld}_{\text{oxi}}$ ), semiquinona (radical  $\text{Fld}_{\text{sq}}$ ) e hidroquinona ( $\text{Fld}_{\text{red}}$ ). Las flavodoxinas reaccionan con una gran variedad de agentes redox, en un proceso que implica el intercambio de dos electrones en dos etapas bien diferenciadas. La captación de un primer electrón por la flavodoxina da lugar a la forma semiquinona, que en la mayoría de las flavodoxinas presentan carácter neutro. La adición de un segundo equivalente reductor, reduce completamente la proteína, dando lugar a la forma hidroquinona. El potencial  $E_2$  ( $\text{Fld}_{\text{oxi}}/\text{Fld}_{\text{sq}}$ ) es siempre más positivo que  $E_1$  ( $\text{Fld}_{\text{sq}}/\text{Fld}_{\text{red}}$ ). Esto le permite una alta versatilidad para funcionar en cadenas de transporte de electrones. El estado semiquinona posee una elevada estabilidad en comparación con el estado hidroquinona, debida fundamentalmente al enlace de hidrógeno de la posición N5 de la flavina y a la presencia de dos residuos aromáticos que rodean el grupo FMN en el complejo formado (Simonsen y Tollin, 1980; McIver *et al.*, 1998; Maldonado *et al.*, 1998). Solamente la forma totalmente reducida de la flavodoxina es funcional en la transferencia de electrones al complejo nitrogenasa responsable de la fijación del nitrógeno.

La ferredoxina  $\text{NADP}^+$  reductasa (FNR) (EC 1.18.1.2) cataliza la transferencia de electrones de forma secuencial y reversible, desde dos moléculas de flavodoxina a una molécula de  $\text{NADP}^+$ , con objeto de almacenar energía en forma de poder reductor en el NADPH (nicotín adenín dinucleótido fosfato). Existen varias isoformas de FNR que se encuentran en cloroplastos, mitocondrias y bacterias participando en una gran variedad de rutas del metabolismo oxidativo (Arakaki *et al.*, 1997). El poder reductor del NADPH o de otros donadores de electrones de bajo potencial tales como la ferredoxina, la adrenoxina o la propia flavodoxina es transferido a metabolitos redox en los plastidios, mitocondrias y bacterias (Ceccarelli *et al.*, 2004). La fijación biológica del nitrógeno catalizada por la nitrogenasa representa un proceso muy costoso con un consumo mínimo estimado de 8 equivalentes reductores de bajo potencial por molécula de nitrógeno reducida. En condiciones fisiológicas normales la provisión del poder reductor para la nitrogenasa está mediada por la ferredoxina y la flavodoxina.

Las flavodoxinas en estado reducido reaccionan fácilmente con especies altamente oxidantes como el ión superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) y pueden ser recicladas cuando se encuentra



disponible una fuente de electrones adecuada. Solamente los complejos metálicos poseen una versatilidad tan alta, como ocurre en catalasas y superóxido dismutasas, pero estos complejos pueden ser destruidos en su interacción con oxidantes, mientras que las flavinas estabilizadas no son afectadas (Keyer et al., 1995).

La cianobacteria fijadora de nitrógeno *Anabaena variabilis* PCC 7119 posee una flavodoxina de cadena larga (168 aminoácidos) sintetizada en condiciones de deficiencia de hierro y que sustituye eficazmente a la ferredoxina tanto en el transporte fotosintético de electrones como en la reducción de la nitrogenasa (Fillat et al., 1988; Sandmann et al., 1990; Razquin et al., 1994). En *Anabaena* PCC 7119 los potenciales redox para los pares flavodoxina semiquinona/reducida y flavodoxina oxidada/semiquinona son respectivamente -390mV y -195mV (Pueyo et al., 1991). La estructura tridimensional de la flavodoxina de *Anabaena* se ha descrito como una proteína  $\alpha/\beta$  con una lámina  $\beta$  libre y cinco laminas  $\beta$  rodeadas por cinco  $\alpha$  hélices en contacto con el solvente (Rao et al., 1992).

En *Escherichia coli*, el descubrimiento de un segundo gen para la flavodoxina (fldB) (Hayes, F., 1995, sin publicar) resultó de especial interés para el regulón *soxRS* que incluye los genes para la flavodoxina I (fldA) (Zheng et al., 1999) y para la ferredoxina (flavodoxina) NADP<sup>+</sup> oxidoreductasa (fpr) (Liochev et al., 1994). El regulón *soxRS* responde frente al estrés oxidativo generado por agentes oxidantes tales como el ión superóxido, óxido nítrico o metilviológeno (Demple, 1996; Weiss, 1998). La proteína SoxR tiene un centro redox (2Fe-2S) similar al de las ferredoxinas y actúa como sensor del regulón. Cuando su centro redox se oxida (Gaudu et al., 1997; Hidalgo et al., 1997) se convierte en un factor transcripcional que activa un segundo factor de transcripción (*soxS*) y todo un conjunto de genes antioxidantes (hidroperoxidasa I, glutatión reductasa, glutaredoxina I, alquil-hidroperoxidasa, etc.). El factor SoxS activa a su vez, otros genes del regulón. En ausencia del estrés oxidativo, las células no inducidas mantienen de forma continua la proteína SoxR en su estado reducido. Tanto la proteína SoxR como la flavodoxina están en un equilibrio redox con el NADP<sup>+</sup>/NADPH (Kobayashi y Tagawa, 1999; Blaschkowski et al., 1982). La flavodoxina II se ha descrito como un nuevo miembro del regulón *SoxRS* pero se desconoce su papel durante el estrés oxidativo (Gaudu y Weiss, 2000). Por su parte, se ha sugerido que la flavodoxina I y la ferredoxina (flavodoxina) NADP<sup>+</sup> oxidoreductasa podrían inducirse para equilibrar el balance redox en las células sometidas al estrés oxidativo (Liochev et al., 1994; Liochev y Fridovich, 1992).

Hasta el momento no se han descrito flavodoxinas en plantas y no se ha identificado ningún homólogo de flavodoxina en el genoma secuenciado de *Arabidopsis thaliana*. La expresión de flavodoxina en el nódulo de la leguminosa podría constituir una estrategia factible para la protección del órgano fijador contra el daño oxidativo y por consiguiente un mecanismo para aumentar la tolerancia del proceso de fijación biológica de nitrógeno frente al estrés salino, y/o el retraso o atenuación de la senescencia natural. Dado que la estructura del nódulo contiene bacterias diferenciadas en el interior de la célula vegetal, proponemos dos aproximaciones o abordajes, consistentes en la expresión de flavodoxina en bacteroides de *Sinorhizobium meliloti* y en plantas de *Medicago truncatula*.

## 6. Objetivos

Objetivo general:

**Expresión de la proteína flavodoxina en el nódulo de leguminosas y estudio del efecto antioxidante de la flavodoxina sobre el proceso de senescencia natural de los nódulos y en la tolerancia al estrés salino.**

Objetivos concretos:

- 1. Expresión de la proteína flavodoxina en bacterias y estudio de la tolerancia al estrés oxidativo en vida libre.**
- 2. Expresión de la proteína flavodoxina en bacteroides y estudio del efecto de la flavodoxina en nódulos de plantas de *Medicago sativa* durante la senescencia natural de los nódulos y en la tolerancia al estrés salino.**
- 3. Expresión de la proteína flavodoxina en plantas de *Medicago truncatula* y estudio del efecto de la flavodoxina en plantas sometidas a estrés salino**



## **Materiales y Métodos**

## 1. Materiales

### 1.1. Material vegetal

#### 1.1.1. *Medicago truncatula* (Gaertn)

Se utilizaron semillas de *Medicago truncatula* (Gaertn.) línea R108-1 (c3) (Trinh *et al.*, 1998), procedente de la línea R108-1 (Hoffmann *et al.*, 1997) tras 3 ciclos sucesivos de regeneración *in vitro*. Dependiendo de los estudios las plantas crecieron en macetas (Fig. 2.1A) o en sobres de crecimiento cyg (Mega-International, West St. Paul, USA) (Fig. 2.1B).

##### 1.1.1.1. Cultivo en macetas

Las semillas se escarificaron mecánicamente (papel de lija nº 2) durante un minuto para facilitar su posterior imbibición. Se esterilizaron con hipoclorito de sodio comercial (8,5%) durante 2 minutos en agitación suave a temperatura ambiente. Seguidamente se lavaron repetidas veces con agua destilada estéril y se dejaron 12 horas a 28° C y 100 rpm para completar la imbibición de la semilla. Las semillas germinadas con la radícula emergente se sembraron en macetas de plástico con mezcla de vermiculita (Asfaltex; Sant Cugat del Vallès, España) y arena calibrada nº 3 (2:1) lavada con agua destilada estéril.

Las plantas crecidas en macetas se mantuvieron en cámara de cultivo en condiciones controladas de humedad (50% de humedad relativa) y temperatura (23° C durante el día y 15° C durante la noche) con un fotoperiodo de 14 horas de luz/día y una intensidad luminosa de ~250  $\mu\text{mol}$  cuantos/ $\text{m}^2\text{s}$ , suministrada por tubos fluorescentes (Silvana Gro-Lux) y bombillas incandescentes. Se regaron con solución nutritiva ISV<sup>+</sup> (Gif-sur-Yvette, Francia) diluida 1/40 en agua destilada.

Tabla 2.1. Solución nutritiva

<u>Solución nutritiva ISV (Gif-sur-Yvette, Francia) 10 L</u>	<u>ISV<sup>+</sup></u>	<u>ISV<sup>-</sup></u>
KNO <sub>3</sub>	20,2 g	5,05 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6,8 g	6,8 g
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	18,25 g	18,25 g
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	6,15 g	6,15 g
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10,875 g	10,875 g
Hampiron, 6,5% Fe (Rhône Poulenc)	2,05 g	2,05 g
Solución A	13,5 ml	13,5 ml

Solución A: H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 11 g/l; MnSO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O 6,2 g/l; KCl 10 g/l; ZnSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 1 g/l; (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> 4H<sub>2</sub>O 1 g/l; CuSO<sub>4</sub> 5H<sub>2</sub>O 0,5 g/l; H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 ml/l

##### 1.1.1.2. Cultivo en sobres e inoculación

Las semillas escarificadas, se esterilizaron con etanol 70% durante 15 minutos, en agitación suave a temperatura ambiente. Se lavaron varias veces con abundante agua



destilada estéril y se dejaron en imbibición a 4° C durante 12 horas. Seguidamente, se colocaron en placas petri de 150 mm de diámetro con agar (0.9%), aproximadamente 30-40 semillas por placa. Las placas se cerraron y se colocaron en posición vertical cubiertas parcialmente con papel de aluminio en cámara de crecimiento durante 2 días (hasta la apertura total de los cotiledones). Las plántulas se dispusieron en los sobres de crecimiento cyg (5-6 plántulas/sobre) con la solución nutritiva (Tabla 2.1).

La inoculación se llevo a cabo 2 días después de la colocación de las semillas germinadas en los sobres cyg. Se inocularon con 250 µl/plántula de un cultivo de *Sinorhizobium meliloti* 2011 en fase exponencial de crecimiento ( $10^8$  ufc/ml).

Las plantas se mantuvieron en cámara de cultivo en condiciones controladas de temperatura (23° C) con un fotoperiodo de 16 horas de luz y una intensidad luminosa de 180 µmol cuantos/m<sup>2</sup>s, suministrada por tubos fluorescentes (Silvana Gro-Lux). Los sobres se mantuvieron inicialmente con 30 ml de solución ISV<sup>-</sup> (Gif-sur-Yvette, Francia) para favorecer la simbiosis, incrementándose el volumen de solución según el crecimiento de las plántulas hasta 60 ml/sobre. La solución nutritiva se renovó completamente cada 7 días.

#### **1.1.1.3. Condiciones de estrés salino**

Los tratamientos de estrés salino se aplicaron a plantas de 4 semanas de edad crecidas en sobres cyg. Consistió en la aplicación durante 2, 3, 4 ó 6 días de NaCl 100 mM incluido en la solución de riego.

#### **1.1.2. *Medicago sativa* L.**

Se utilizaron semillas de *Medicago sativa* cv. Aragon R-1 (Rocalba, Gerona, España) (Fig. 2.1C-D).

##### **1.1.2.1. Cultivo en sobres e inoculación**

Las semillas se esterilizaron con etanol 70% durante 10 minutos en agitación suave a temperatura ambiente. Tras varios lavados con agua destilada estéril, las semillas fueron tratadas con HgCl<sub>2</sub> (0,1%) durante 2 minutos. Inmediatamente se lavaron varias veces y abundantemente con agua destilada estéril. Finalmente, las semillas se colocaron en placas petri de 90 mm de diámetro con agar (0,9%), aproximadamente 20-30 semillas por placa. Las placas se cerraron y cubrieron totalmente con papel de aluminio y se colocaron en posición invertida en cámara de crecimiento durante 36 horas. Las plántulas se dispusieron en sobres de crecimiento cyg (7-8 plántulas/sobre) con la solución de riego (Tabla 2.1).

La inoculación se llevo a cabo 2 días después de la colocación de las semillas germinadas en los sobres cyg. Se inocularon con 250 µl/plántula de un cultivo de *Sinorhizobium meliloti* 2011 en fase exponencial de crecimiento ( $10^8$  ufc/ml).

Las plantas crecidas en sobres cyg se mantuvieron en cámara de cultivo en condiciones anteriormente descritas para las plantas crecidas en sobres cyg de *Medicago truncatula* (Gaertn.) (Materiales y Métodos 1.1.1.2).

##### **1.1.2.2. Condiciones de estrés salino**

Los tratamientos de estrés salino se aplicaron sobre plantas de 18 días de edad crecidas en sobres cyg. Consistió en la aplicación de NaCl 100mM durante 2, 3 ó 4 días.



En los estudios de nodulación bajo condiciones de salinidad, se aplicaron varias concentraciones de NaCl (10, 25, 50 y 100 mM) incluido en la solución nutritiva desde el momento de la inoculación.

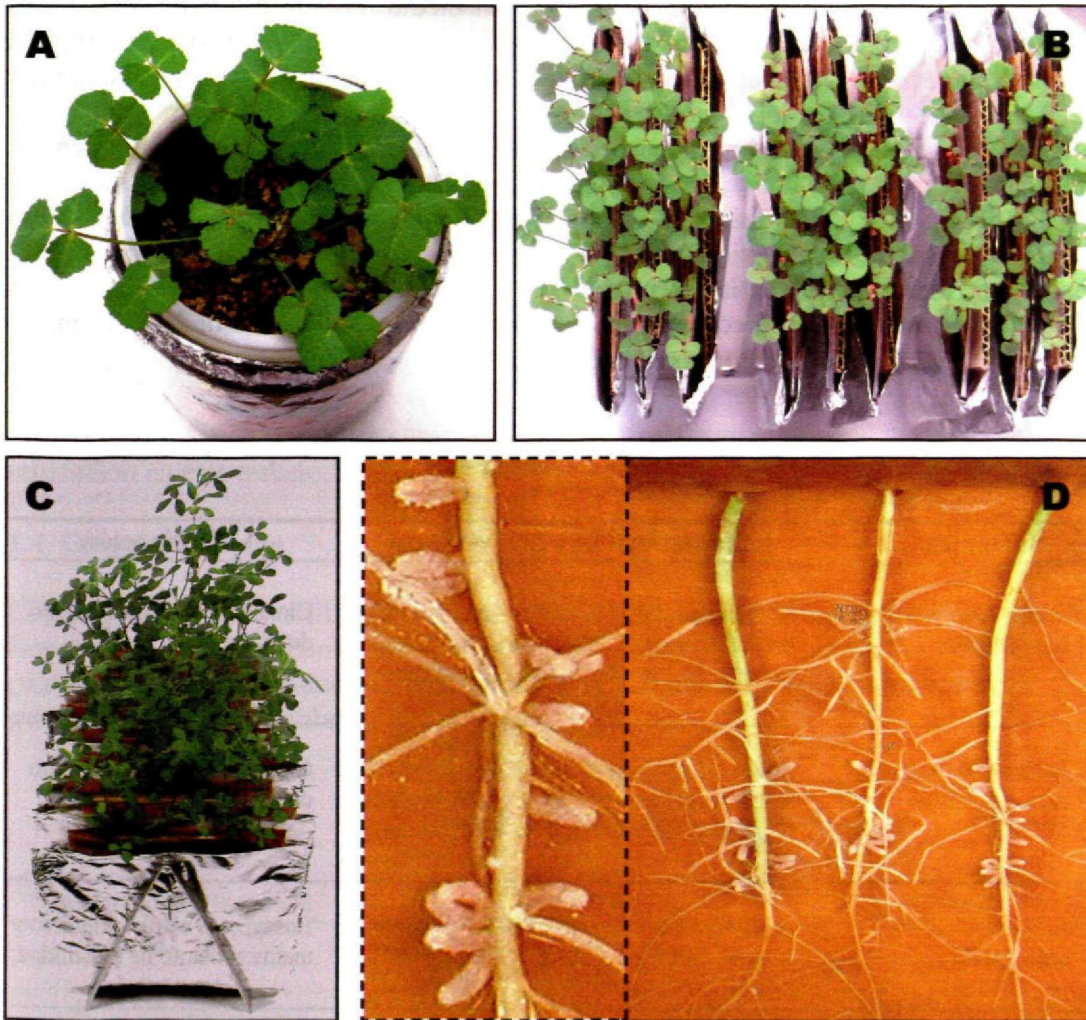


Figura 2.1. **Material vegetal.** Plantas de *Medicago truncatula* (Gaertn.) creciendo en macetas de plástico (A) y en sobres crecimiento cyg (B). Plantas de *Medicago sativa* L. creciendo en sobres cyg (C) y sistema radical mostrando nódulos (D).

## 1.2. Bacterias

Las bacterias empleadas, su procedencia, las características más relevantes, y su utilización en este trabajo se indican en la Tabla 2.2

### 1.2.1. Condiciones de crecimiento y medios de cultivo

Las cepas de *Escherichia coli* se cultivaron en medio LB (Sambrook *et al.*, 1989) (bactotripton 10 g/l; extracto de levadura 5 g/l; NaCl 10 g/l, pH 7) con el antibiótico de selección adecuado, a 37° C y en agitación (200-250 rpm).



Las cepas de *Sinorhizobium meliloti* se cultivaron en medio Vincent (Vincent, 1970) ( $K_2HPO_4$  0,5g/l;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0,2 g/l; manitol 10g/l; extracto de levadura 0,4g/l; NaCl 0,1g/l, pH 6,8) o en medio TY (Sambrook *et al.*, 1989) (bactotripton 6 g/l; extracto de levadura 3 g/l;  $CaCl_2 \cdot 7H_2O$  0,66 g/l, pH 6,8) con el antibiótico de selección adecuado, a 28° C y en agitación (150-200 rpm).

La cepa de *Agrobacterium tumefaciens* creció en medio YEB (Sambrook *et al.*, 1989) (extracto de carne 5 g/l; extracto de levadura 1 g/l; peptona 5 g/l; sacarosa 5 g/l;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0,2 g/l, pH 7,2) con el antibiótico de selección adecuado, a 30° C y en agitación (200 rpm).

La cepa de *Pseudomonas fluorescens* creció en medio LB con el antibiótico de selección adecuado, a 28° C y en agitación (200 rpm).

Para la preparación de células electrocompetentes de *Escherichia coli* y *Agrobacterium tumefaciens*, se utilizó medio 2xYT (Sambrook *et al.*, 1989) (bactotripton 16 g/l; extracto de levadura 10 g/l; NaCl 5 g/l, pH 7).

Las diferentes cepas fueron conservadas de forma indefinida en glicerol 20 % a -80° C previamente congeladas en nitrógeno líquido.

Tabla 2.2. Bacterias

Bacterias	Características y procedencia	Utilización
<i>Escherichia coli</i> cepa DH5 $\alpha$	F $\Phi$ 80 $\Delta$ lacZM15 $\Delta$ (lacZYA-argF) U169 deoR recA1 endA1 hsdR17( $r_k^-$ , $m_k^-$ ) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 $\lambda^-$ (Invitrogen)	Clonación y mantenimiento de plásmidos.
<i>Escherichia coli</i> cepa XL 1-Blue MRF'	$\Delta$ (mcrA)183 $\Delta$ (mcrCB-hsdSMR-mrr)173 recA1 endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 [F' proAB lacI <sup>q</sup> ZAM15] Su <sup>-</sup> (Stratagene)	Clonación y mantenimiento de plásmidos.
<i>Escherichia coli</i> cepa TG1	supE hsdA5 thi-1 $\Delta$ (lac-proAB F [traD36 proAB' lacI <sup>q</sup> lacZ $\Delta$ M15] (Gibson, 1984)	Ensayos de estrés oxidativo y mantenimiento de plásmidos.
<i>Sinorhizobium meliloti</i> cepa 2011	Sm <sup>-</sup> Procede de la cepa SU-47 (Casse <i>et al.</i> 1979)	Simbiosis con <i>M. sativa</i> y <i>M. truncatula</i> .
<i>Sinorhizobium meliloti</i> cepa 2011 Rif <sup>R</sup>	Rif <sup>R</sup> Procede de la cepa 2011 (este trabajo)	Ensayos de estrés oxidativo y simbiosis.
<i>Pseudomonas</i> <i>fluorescens</i> cepa aur6	Aislado de rizosfera de <i>Lupinus hispanicus</i> (Gutierrez Mañero <i>et al.</i> 2003)	Ensayos de estrés oxidativo
<i>Agrobacterium</i> <i>tumefaciens</i> cepa EH-105	Fondo cromosómico C58, Ti pEHA-105 rif, succinamopina (Hood <i>et al.</i> 1993)	Transformación de <i>Medicago</i> <i>truncatula</i> (Gaertn).

### 1.2.2. Condiciones de estrés oxidativo

Para los ensayos de estrés oxidativo en medio sólido, se utilizaron cultivos en fase exponencial y se realizaron conteos de las unidades formadoras de colonias (ufc) a las 24, 36 y 48 horas respectivamente. Los ensayos se llevaron a cabo en placas petri de LB sólido (bactoagar 15 g/l) para los estudios con *Escherichia coli* y *Pseudomonas fluorescens* y TY sólido (bactoagar 15 g/l) para los estudios con *Sinorhizobium meliloti*. Las placas estaban suplementadas con las diferentes concentraciones de los agentes oxidantes: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,01-0,5mM), metilviológeno (0,005-0,15mM) y atrazina (0,001-0,2 mM). Se realizaron ensayos de estrés oxidativo por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en medio líquido con *Escherichia coli*. Se utilizaron cultivos en la mitad de la fase exponencial ( $Do_{600nm}=0,5$ ) a los que se les aplicó H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10-25mM). Se siguió el crecimiento del cultivo espectrofotométricamente ( $Do_{600nm}$ ) y mediante conteos de las unidades formadoras de colonias (ufc) a las 24 horas.

### 1.3. Plásmidos

En la Tabla 2.3 se resumen las características de los diferentes plásmidos y vectores y su utilización en este trabajo.

### 1.4. Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo han sido sintetizados por la compañía Genotek (Bonsai Technologies Group, Madrid, España). La secuencia nucleotídica (sentido 5'-3'), temperatura de hibridación y el tamaño del fragmento amplificado del gen se detallan en la Tabla 2.4.

Tabla 2.3. Plásmidos

Nombre del Plásmido	Características	Utilización
<b>pTrc99a</b> (Amman <i>et al.</i> 1988)	Vector de expresión inducible a partir del promotor Ptrc (IPTG) Gen de resistencia a ampicilina Replicón pMB1 de alto número de copia Tamaño: ~ 4,2 kb	Control negativo en los ensayos de estrés oxidativo
<b>pTrc99a-Fld</b> (Fillat <i>et al.</i> , 1991)	Derivado del vector pTrc99a Gen de flavodoxina de <i>Anabaena variabilis</i> PCC 7119 Tamaño: ~ 4,7 kb	Expresión de flavodoxina en los ensayos de estrés oxidativo
<b>pFAJ1709</b> (Dombrecht <i>et al.</i> , 2001)	Vector de expresión constitutiva promotor PnptII, Ori V y Ori T Genes de estabilidad de pNGR234a (y4dLM, y4mFE) Gen de resistencia a tetraciclina Tamaño: ~ 9,9 kb	Control negativo en los ensayos de estrés oxidativo y experimentos de simbiosis en <i>M. sativa</i>



Nombre del Plásmido	Características	Utilización
<b>pFAJ1709-Fld</b> (presente trabajo)	Derivado del vector pFAJ1709 Gen de flavodoxina de <i>Anabaena variabilis</i> PCC 7119 Tamaño: ~ 10,4 kb	Expresión de flavodoxina en ensayos de estrés oxidativo y experimentos de simbiosis en <i>M. sativa</i>
<b>pRK2013</b> (Figurski y Helinski, 1979)	Vector de complementación en trans para movilidad de plásmidos por conjugación Gen de resistencia a kanamicina Replicón colE1, elementos RK2, tn903 Tamaño: ~ 4,8 kb	Plásmido movilizador para la transformación mediante conjugación de <i>S. meliloti</i> y <i>P. fluorescens</i>
<b>pBI121-BarGus</b> (Trieu <i>et al.</i> , 2000)	Plásmido binario derivado de pBI121-Gus (Jefferson <i>et al.</i> , 1987) Gen marcador de resistencia bar de pSIJ525 (Jones <i>et al.</i> , 1992) Rb-Km <sup>R</sup> -35S-bar-OCS-35S-gus-NOS-Lb Ori V y Ori E1; Resistencia a kanamicina Tamaño: ~ 16 kb	Plásmido binario para la transformación de <i>M. truncatula</i> (control negativo) mediante <i>A. tumefaciens</i>
<b>pFLX</b> (Dr. Nestor Carrillo)	Plásmido binario derivado de pCAMBIA2200 (Hajdukiewicz <i>et al.</i> , 1994) Gen de flavodoxina de <i>Anabaena variabilis</i> PCC 7119 precedido del péptido tránsito del gen de la ferredoxina de <i>Pisum sativum</i> (35S-pfmr-fld-35S) Tamaño: ~ 10,6 kb	Clonación del casete de expresión de flavodoxina en pFLD
<b>pFLD</b> (presente trabajo)	Plásmido binario derivado de pBI121-BarGus Gen de flavodoxina de <i>Anabaena variabilis</i> PCC 7119 precedido del péptido tránsito del gen de la ferredoxina de <i>Pisum sativum</i> (35S-pfmr-fld-35S) procedente de pFLX Tamaño: ~ 10,6 kb.	Plásmido binario para la expresión de flavodoxina en <i>M. truncatula</i> mediante su transformación por <i>A. tumefaciens</i>

Tabla 2.4. Oligonucleótidos

Nombre	Secuencia (5' → 3')	Tm (° C)	Utilización
fld-XbaI3	5'-GAT CTA GAT TCA TAA TGT CAA AG-3'	55,3	Flavodoxina (543 pb)
fld-KpnI3	5'-ACT GGT ACC TTT TTA CAA ACC AAA T-3'	56,4	

Nombre	Secuencia (5'→3')	T <sub>m</sub> (° C)	Utilización
fld-D2	5'-CAA AGA AAA TTG GTT TAT TCT ACG G-3'	56,4	Flavodoxina (502 pb)
fld-R2	5'-CCA AAT TCA GAC TTT AAT TGA GCA-3'	55,9	
gus-D1	5'-TCA GCG TTG AAC TGC GTG AT-3'	57,3	β-glucuronidasa (723 pb)
gus-R1	5'-TGT GAG CGT CGC AGA ACA TT-3'	57,3	

## 2. Técnicas moleculares

### 2.1 Purificación de ácidos nucleicos

#### 2.1.1. Aislamiento de ADN plasmídico de bacterias

##### 2.1.1.1. Aislamiento de ADN plasmídico de *Escherichia coli*

Para la extracción rutinaria del ADN plasmídico se siguió el método modificado de lisis alcalina (Birboim y Doly, 1979) según Le Gouil *et al.* (1994). Se centrifugó 1,5 ml de cultivo bacteriano y se resuspendió el precipitado en 100 µl de la solución I (glucosa 50 mM; Tris-HCl 25 mM, pH 8; EDTA 10 mM; RNasa A 100 µg/ml). Se lisaron las células con la adición de 200 µl de solución II (NaOH 0,2N; SDS 1%) seguidos de 200 µl de cloroformo. Después de 2 minutos de lisis, se neutralizó con 150 µl de solución III (acetato potásico 3 M; ácido fórmico 1,3 M) y se mezcló con ayuda de vortex durante 2-3 segundos. Se centrifugó durante 5 minutos a 13.200 rpm y se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo. El ADN se precipitó con la adición de 2 volúmenes de etanol absoluto frío y se lavó con etanol 70 %. Finalmente se resuspendió en 20 µl de agua bidestilada.

La extracción del ADN plasmídico de mayor grado de pureza y/o de mayores cantidades de plásmido, se realizó mediante kits comerciales. Para extracciones a pequeña escala se utilizó el kit Quantum Prep (Bio-Rad, Hercules, USA) y para extracciones a pequeña escala se utilizó el kit Plasmid Midi (Qiagen, Hilden, Alemania), siguiendo en ambos las recomendaciones e instrucciones del fabricante.

Para la purificación y limpieza de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa, se utilizó el kit SpinPrep Gel DNA (Novagen, Madison, USA) y para la limpieza de fragmentos de ADN a partir de medios líquidos, se utilizó el kit Eazy Nucleic Acid Isolation Cycle-Pure (Omega Bio-tek, Doraville, USA) siguiendo en ambos las instrucciones del fabricante.

##### 2.1.1.2. Aislamiento de ADN plasmídico de *Agrobacterium tumefaciens*, *Sinorhizobium meliloti* y *Pseudomonas fluorescens*

Para la extracción del ADN plasmídico de estas bacterias, se siguió una adaptación del método rutinario anteriormente descrito para *Escherichia coli*. Previo a la lisis celular, se realizó un tratamiento con 20 µl de lisozima (20 mg/ml) durante 15 minutos a 37° C. Seguidamente se procedió a la lisis alcalina (solución II) durante 5 minutos en hielo. Se neutralizó con 150 µl de la solución IIIB (acetato potásico 3 M; ácido acético glacial 11% v/v), se mezcló con vortex durante 5-6 segundos y se incubó en hielo durante 5 minutos. Se centrifugó durante 5 minutos y se transfirió el sobrenadante a un nuevo



tubo. Se añadieron 100 µl de NaCl 5 M y se mezcló suavemente con la ayuda de la pipeta. Se añadieron 80 µl de la solución IV (CTAB 10% p/v; NaCl 0,7 M) precalentada, se mezcló e incubó durante 10 minutos a 65° C. Se centrifugó durante 5 minutos y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo. Seguidamente, se añadió un volumen de fenol / cloroformo / alcohol isoamílico (25:24:1) y se mezcló con la ayuda de vortex. De nuevo se centrifugó durante 5 minutos y se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo. Se añadió un volumen de cloroformo / alcohol isoamílico (24:1), se mezcló con la ayuda de vortex y se volvió a centrifugar y a transferir la fase acuosa a un nuevo tubo. Se añadieron 0,6 volúmenes de isopropanol, se incubó durante 10 minutos en hielo para la precipitación del ADN y se lavó con etanol 70 %. Finalmente el sedimento se resuspendió con 10 µl de agua bidestilada.

### 2.1.2. Aislamiento de ADN genómico

El ADN genómico se aisló de hojas de *Medicago truncatula* mediante el kit DNeasy Plant Mini (Qiagen). El material vegetal se pulverizó en mortero en presencia de nitrógeno líquido y se siguieron las instrucciones del fabricante. En cada extracción se utilizaron aproximadamente 250 mg del pulverizado. El ADN se resuspendió en 150 µl de tampón TE (Tris-HCl 10mM; EDTA 1mM; pH 8).

### 2.1.3. Aislamiento de ARN total

Para la extracción del ARN, hojas de *Medicago truncatula* fueron pulverizadas en mortero en presencia de nitrógeno líquido. A partir de 100 mg del pulverizado se obtuvo el ARN total utilizando el kit RNeasy Plant Mini (Qiagen). Durante la extracción las muestras fueron tratadas con RNase-free DNase I (Qiagen) para eliminar restos de ADN genómico de las muestras de ARN, todo ello siguiendo las instrucciones y recomendaciones del fabricante. El ARN se resuspendió en 50 µl de agua bidestilada libre de RNasas.

## 2.2. Construcción de vectores

Para la construcción del plásmido pFAJ1709-Fld (Fig. 2.2) se amplificó mediante PCR el gen de la flavodoxina de *Anabaena variabilis* PCC 7119 utilizando como molde el plásmido pTrc99a-Fld (Tabla 2.2). Se utilizaron los oligonucleótidos fld-XbaI3 y fld-KpnI3 para generar dianas de restricción Xba I y Kpn I. El fragmento fue amplificado y digerido con las citadas enzimas se ligó en el plásmido pFAJ1709 previamente digerido con XbaI y KpnI. Las reacciones de secuenciación para comprobar la secuencia del gen clonado, fueron realizadas en el Servicio de Secuenciación Automática de ADN del Centro de Investigaciones Biológicas del CSIC. Se utilizó un secuenciador ABI PRISM, modelo 377 (PE Applied Biosystems, Foster City, USA).

Para la construcción del plásmido binario pFLD (Fig. 2.3) se partió del plásmido pFLX (Tabla 2.2) que contiene el gen de la flavodoxina de *Anabaena variabilis* fusionado al péptido tránsito de la ferredoxina de *Pisum sativum* e incluido en un casete de expresión. El plásmido pFLX fue digerido con la enzima de restricción EcoR I para la liberación del casete. El plásmido binario pBI121-BarGus se digirió con EcoR I y se trató con fosfatasa alcalina (USB, Cleveland, USA). Finalmente se ligó el casete escindido y el plásmido linearizado y se comprobaron las orientaciones mediante digestiones enzimáticas.

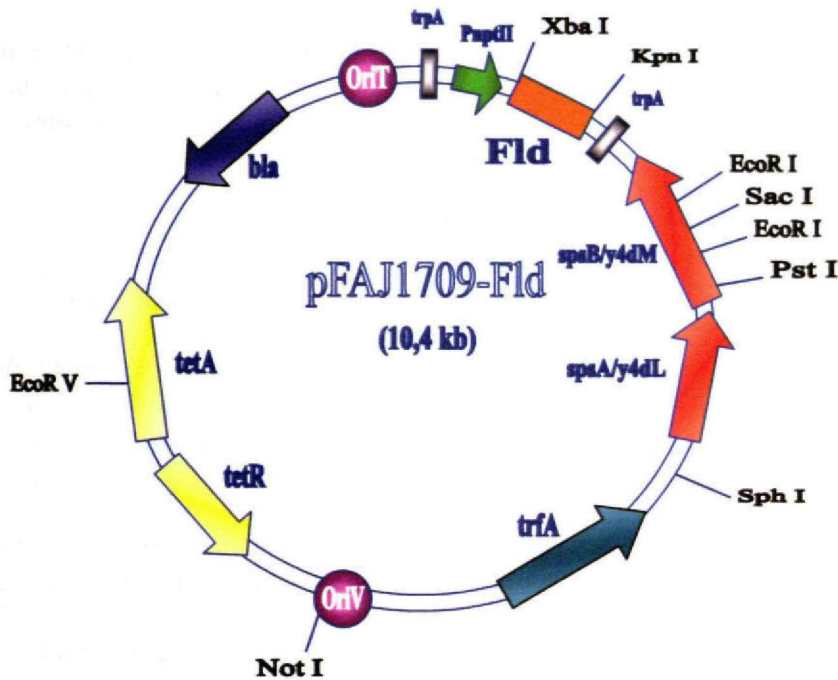


Figura 2.2. Plásmido pFAJ1709-Fld. (bla) β-lactamasa; (tetA y tetR) resistencia a tetraciclina; (trfA) proteína de inicio de replicación; (OriV) origen de replicación IncPα; (OriT) origen de transferencia; (trpA) terminador transcripcional; (PnptII) promotor de la neomicina fosfotransferasa; (spaA/y4dL y spaB/y4dM) loci de estabilidad plasmídica.

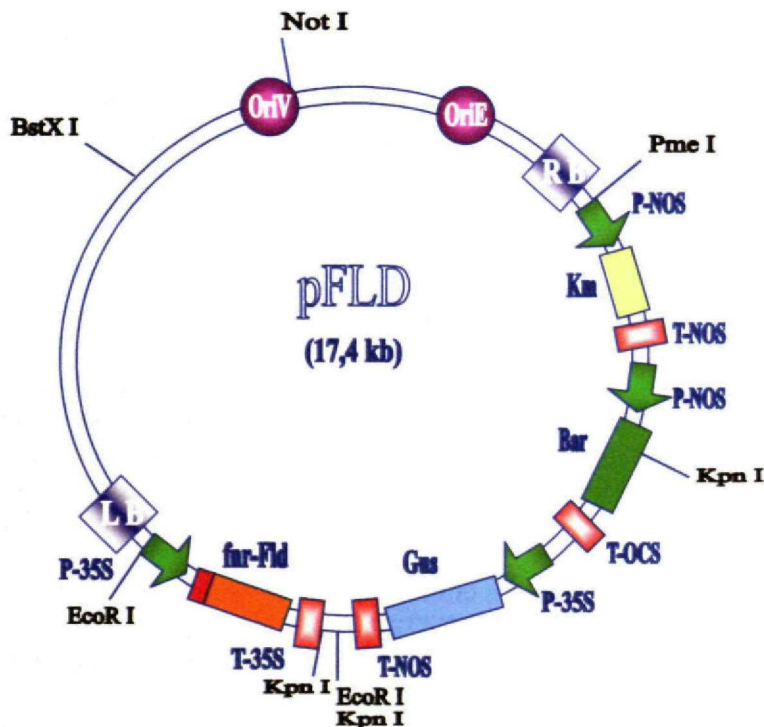


Figura 2.3. Plásmido pFLD. Región del T-DNA, flanqueada por las secuencias señal (RB y LB); resistencia a kanamicina (Km) bajo promotor y terminador de la nopalina sintetasa (NOS); resistencia al herbicida BASTA (bar) bajo promotor de la NOS y terminador de la octopina sintetasa (OCS); marcador de la β-glucuronidasa (Gus) bajo promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) y terminador de la NOS; gen de la flavodoxina (Fld) fusionado al péptido tránsito de la ferredoxina NADP<sup>+</sup> oxidoreductasa (Fnr) bajo promotor y terminador del 35S de CaMV.



Para las reacciones de ligación se utilizaron combinaciones de 80 ng totales de ADN en relación molar 1:3 - 1:10 entre el vector e inserto respectivamente. Se utilizaron de 0.05-1 unidades de T4 DNA ligasa (USB). Las reacciones de ligación se realizaron a 16° C durante 16 horas.

## 2.3. Southern blot

### 2.3.1 Digestión enzimática, electroforesis y transferencia a membrana

Alícuotas de 10 µg de ADN genómico se digirieron independientemente con 90 unidades de la enzima de restricción *Xba* I durante 16 horas a 37° C. Se inactivó la enzima por calor durante 15 minutos a 65° C. El ADN digerido se precipitó con sales de acetato sódico y etanol (Sambrook *et al.*, 1989) y se resuspendió en 13 µl de tampón TE (Tris-HCl 10mM; EDTA 1mM; pH 8).

Los fragmentos de ADN se separaron a bajo voltaje (1 V/cm) mediante electroforesis en un gel de agarosa (0,7 %) con bromuro de etidio (0,5 µg/ml) en tampón TAE 1x (Tris 40 mM; EDTA 1 mM). Como marcador de peso molecular se utilizó el ADN del bacteriófago λ digerido con *Bst*E II (New England Biolabs, Ipswich, USA).

El gel de electroforesis se trató con la solución de depurinización (HCl 0,2 N) durante 15 minutos en agitación suave para producir la depurinización del ADN. A continuación, se incubó en la solución de desnaturalización (NaCl 1 M; NaOH 0,5 N) durante dos periodos de 15 minutos en agitación suave y seguidamente, se neutralizó mediante dos periodos de 15 minutos de incubación en agitación suave en la solución de neutralización (Tris-HCl 0,5 M, pH 7,4; NaCl 1,5 M). Finalmente se equilibró el gel en la solución de transferencia 20xSSC (NaCl 3 M; C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>7</sub> 2H<sub>2</sub>O 0,3 M, pH 7) durante 10 minutos en agitación suave.

La transferencia del ADN a la membrana de nailon cargada positivamente Zeta Probe (Bio-Rad) se llevó a cabo por capilaridad en condiciones neutras (20xSSC). La membrana se lavó en 2xSSC y se dejó secar. El ADN se fijó a la membrana mediante irradiación con luz ultravioleta a 254 nm (Spectrolinker XL-100 UV crosslinker; Spectronics Corporation, Westbury, USA).

### 2.3.2 Hibridación, lavados e inmunodetección

La sonda marcada con digoxigenina se preparó mediante el marcaje directo de fragmentos de ADN amplificados por PCR en presencia de UTP marcado con digoxigenina. Se preparó con el kit comercial PCR DIG Probe Síntesis (Roche, Mannheim, Alemania) según instrucciones y recomendaciones del fabricante. Los oligonucleótidos y condiciones que se utilizaron se encuentran detallados en la Tabla 2.4.

Los procesos de prehibridación e hibridación se llevaron a cabo en bolsas de hibridación (Roche) en agitación suave y a 42° C ( $T_{hib}$ ) según la formula:

$$T_{hib} = T_m - 61; \text{ donde } T_m = 16,6 \log [\text{Mol Na}^+] + 0,41 (\% \text{ G+C}) + 81,5.$$

La membrana se prehibridó durante 30 minutos a 42° C en la solución de hibridación (5xSSC; formamida desionizada 50% v/v; N-Laurilsarcosina 0,1 % p/v; SDS 7 % p/v; solución de bloqueo 2 % v/v; fosfato sódico 50mM, pH 7) a razón de 0,1 ml/cm<sup>2</sup>.

La sonda se desnaturalizó durante 5 minutos a 100° C e inmediatamente se enfrió en hielo y se añadió a la solución de hibridación (0,05 ml/cm<sup>2</sup>) precalentada a 42° C. Se hibridó la membrana durante 16 horas a 42° C. Se realizaron dos lavados de 5 minutos a



temperatura ambiente en la solución de lavado de baja astringencia (2xSSC; SDS 0,1 % p/v) y seguidamente dos lavados de 15 minutos a 65° C en solución de lavado de alta astringencia (0,5xSSC; SDS 0,1 % p/v).

Antes del bloqueo, la membrana se equilibró en tampón de lavado [tampón ácido maleico (ácido maleico 100 mM; NaCl 150 mM; pH 7,5); Tween 20 0,3 %] durante 5 minutos. Seguidamente, se incubó en solución de bloqueo (Blocking solution, vial 6 del kit DIG High Prime Labelling and Detection Starter de Roche, diluido 1:10 en tampón ácido maleico) durante 30 minutos en agitación suave.

La membrana se incubó en la solución de anticuerpo (anticuerpo anti-DIG conjugado a fosfatasa alcalina, vial 4 del kit DIG High Prime Labelling and Detection Starter de Roche, diluido 1:5000 en solución de bloqueo) durante 60 minutos en agitación suave. Seguidamente se realizaron dos lavados de 15 minutos en tampón de lavado.

Para la inmunodetección, se equilibró la membrana en tampón de detección (Tris-HCl 100 mM; NaCl 100 mM; pH 9,5) durante 5 minutos. A continuación se incubó la membrana en 10 ml de la solución de revelado (NBT/BCIP, vial 5 del kit DIG High Prime Labelling and Detection Starter de Roche, diluido 1:50 en tampón de detección). El revelado se realizó sin agitación y en oscuridad. La reacción de la fosfatasa alcalina se paró con tampón TE (Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM; pH 8) y la membrana se dejó secar.

## 2.4 Amplificación por PCR

La amplificación por PCR de las diferentes muestras se llevó a cabo en 20 µl de mezcla de reacción [1× tampón de PCR (Applied Biosystems), 0,20 mM dNTPs, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 µM oligonucleótidos, y 1 U de polimerasa AmpliTaq Gold (Applied Biosystems)]. Se utilizó un termociclador Hybaid PCR Express DNA (Perkin-Elmer, Applied Biosystems) con el siguiente programa básico:

	<b>Etapas</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Ciclos</b>
1	Activación enzimática	95° C	5 minutos	1
2	Amplificación			n
2.1	Desnaturalización del ADN	95° C	1 minuto	
2.2	Hibridación oligonucleótidos	tm	1 minuto	
2.3	Polimerización	72° C	2 minutos	
3	Polimerización final	72° C	10 minutos	1

(n = ciclos de hibridación; tm = temperatura hibridación de los oligonucleótidos)

Se amplificó el gen de la flavodoxina de *Anabaena variabilis* PCC 7119 con los oligonucleótidos fld-XbaI3 y fld-KpnI3 (tm=45° C, n=35) para su posterior clonaje dirigido en el plásmido pFAJ1709 (tabla 3).

En las amplificaciones del gen de la flavodoxina de *Anabaena variabilis* PCC 7119 para su detección en bacterias, bacteroides o ADN genómico de *Medicago truncatula* se utilizaron los oligonucleótidos fld-D2 y fld-R2 (tm=56° C, n=30-40) o los oligonucleótidos fld-XbaI3 y fld-KpnI3 (tm=45° C, n=35).



En la fabricación de la sonda marcada con digoxigenina del gen de la  $\beta$ -glucuronidasa se utilizaron los oligonucleótidos gus-D1 y gus-R1 ( $t_m=57^\circ\text{C}$ ,  $n=36$ ).

## 2.5 Análisis de expresión por RT-PCR

Para la síntesis de ADNc de cadena sencilla se utilizó el kit comercial 1<sup>st</sup> Strand cDNA Synthesis (Roche) para las reacciones de retrotranscripción de los ARNs extraídos. Los ADNc de cadena sencilla fueron obtenidos a partir de 1  $\mu\text{g}$  de ARN mediante la enzima transcriptasa reversa AMV (Roche). Como cebadores se usaron nucleótidos oligo-p (dT)<sub>15</sub>. La mezcla de reacción (50  $\mu\text{l}$ ) con las concentraciones recomendadas por el fabricante se incubó en el termociclador con el siguiente programa de retrotranscripción:  $25^\circ\text{C}$ , 10 minutos;  $42^\circ\text{C}$ , 60 minutos;  $95^\circ\text{C}$ , 5 minutos y  $4^\circ\text{C}$ , 5 minutos. Las muestras de ADNc se alícuotaron y conservaron a  $-20^\circ\text{C}$ .

Se utilizó el ADNc como molde para la amplificación por PCR en el termociclador según se detalla en el punto 2.4. Se utilizaron los oligonucleótidos fld-R1 y fld-R2 ( $t_m=56^\circ\text{C}$ ,  $n=35$ ).

Para detectar la expresión del gen de la flavodoxina de *Anabaena variabilis* PCC 7119 en *Medicago truncatula* se utilizó el ADNc (2  $\mu\text{l}$  dilución 1/10) como molde para la amplificación por PCR en el termociclador según se detalla en el punto 2.4 de Materiales y Métodos. Se utilizaron los oligonucleótidos fld-D2 y fld-R2 ( $t_m=56^\circ\text{C}$ ,  $n=35$ ).

## 3. Técnicas de transformación

### 3.1. Transformación de *Escherichia coli*

Se prepararon células de *Escherichia coli* de las cepas DH5 $\alpha$  (Invitrogen, Carlsbad, USA) y XL-1 Blue (Stratagene, La Jolla, USA) para ser transformadas mediante electroporación con los plásmidos pFLD y pFAJ1709-Fld (Figuras. 2.2 y 2.3).

#### 3.1.1. Preparación de células electrocompetentes

Se inocularon 2 ml de medio LB con una colonia bacteriana y se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  y 200 rpm durante la noche. Se realizó una dilución 1:100 del preinóculo en 100 ml de medio rico 2TY hasta que el cultivo alcanzó una DO<sub>600</sub> de 0,5. Se enfrió el cultivo en hielo durante un mínimo de 30 minutos. A partir de este momento, el resto de las etapas se llevaron a cabo a  $4^\circ\text{C}$ . A continuación, se centrifugó el cultivo a 5000 rpm durante 10 minutos, se eliminó todo el sobrenadante y se resuspendió el precipitado suavemente con pipeta en 50 ml de agua bidestilada estéril previamente enfriada. Se dejó enfriar en hielo durante 15 minutos y se volvió a centrifugar bajo las condiciones anteriormente descritas. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado suavemente con pipeta en 25 ml de agua bidestilada estéril previamente enfriada. Se centrifugó nuevamente, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado suavemente con pipeta en 5 ml de glicerol 10 % (v/v) estéril previamente enfriado. Se centrifugó por última vez, se eliminó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió suavemente con pipeta en un volumen de glicerol 10 % (v/v) estéril previamente enfriado hasta una concentración final de  $10^{10}$ - $10^{11}$  ufc/ml. Se hicieron alícuotas de 40  $\mu\text{l}$  y se utilizaron seguidamente en la transformación o se conservaron a  $-80^\circ\text{C}$  hasta su posterior utilización (previa congelación en nitrógeno líquido).



### 3.1.2. Electroporación

Se descongelaron en hielo alícuotas de células electrocompetentes (40  $\mu$ l) y se mezclaron con 0,5 - 3  $\mu$ l de DNA (resuspendido en agua bidestilada). La mezcla se transfirió a cubetas enfriadas de electroporación de 0,2 cm (Gene Pulser; Bio-Rad). Seguidamente, se sometieron a un campo eléctrico de 12,5 kV/cm durante 4,8-5,4 milisegundos en un electroporador (*E. coli* Pulser Electroporator; Bio-Rad). Rápidamente, las células se resuspendieron en 0,5 ml de medio SOC y se recuperaron incubándose durante 1 hora a 37° C en agitación suave (Orbital Shaker; Forma-Scientific, Marietta, USA). Tras el tiempo de recuperación, se sembraron en placas de medio LB sólido (bactoagar 15 g/l) con la concentración adecuada del antibiótico correspondiente para la selección de las bacterias transformadas, y se incubaron durante 24 horas a 37° C.

### 3.2. Transformación de *Agrobacterium tumefaciens*

Se prepararon células electrocompetentes de *Agrobacterium tumefaciens* EHA-105 (Hood *et al.*, 1993) para transformarlas mediante electroporación con el plásmido pFLD (Fig. 2.3).

Se siguió el protocolo descrito para *Escherichia coli* (Materiales y Métodos 3.1) con algunas modificaciones. Se utilizaron 50 ml y 5 ml de glicerol 10% (v/v) estéril previamente enfriado respectivamente para la primera y segunda resuspensión y un determinado volumen de glicerol 10% (v/v) estéril previamente enfriado para obtener una concentración final de  $10^{11}$ - $10^{12}$  ufc/ml. Las alícuotas de células electrocompetentes (40  $\mu$ l) descongeladas se mezclaron con 0,5 -1,5  $\mu$ l de DNA (resuspendido en agua bidestilada).

### 3.3. Transformación de *Sinorhizobium meliloti*

Se prepararon bacterias de *Sinorhizobium meliloti* 2011 Rifampicina<sup>R</sup> para transformarlas mediante conjugación triparental con los plásmidos pFAJ1709 y pFAJ1709-Fld (Tabla 2.3).

#### 3.3.1. Obtención de *Sinorhizobium meliloti* Rifampicina<sup>R</sup>

Se inocularon 2 ml de medio Vincent con una colonia bacteriana de *Sinorhizobium meliloti* cepa 2011 y se incubó a 28° C y 200 rpm durante 48 horas. Se realizó una dilución 1:100 del preinóculo en 100 ml de medio Vincent hasta que el cultivo alcanzó un DO<sub>600</sub> de 1 - 1,2. Se sembraron en placas de medio TY sólido (bactoagar 15 g/l) con rifampicina (100  $\mu$ g/ml) y se incubaron durante 48 horas a 28° C. Se aislaron colonias de *Sinorhizobium meliloti* 2011 Rifampicina<sup>R</sup> y se testó la capacidad simbiótica con leguminosas (capacidad de nodulación y fijación de nitrógeno).

#### 3.3.2. Conjugación

Se prepararon preinóculos de 2ml a partir de colonias aisladas de *Escherichia coli* cepa DH5 $\alpha$  / pFAJ1709 o /pFAJ1709-Fld (donadoras), *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  / pRK2013 (movilizadora) y *Sinorhizobium meliloti* 2011 Rifampicina<sup>R</sup> (receptora), en LB tetraciclina (20  $\mu$ g/ml), LB kanamicina (50  $\mu$ g/ml), y Vincent rifampicina (100  $\mu$ g/ml), respectivamente. Se realizaron diluciones 1:100 de los preinóculos en 20 ml de los



respectivos medios de cultivo y con los correspondientes antibióticos, y se incubaron hasta alcanzar una  $DO_{600}$  de 0,8. Se centrifugaron los cultivos a 7000 rpm durante 5 minutos, se eliminaron los sobrenadantes y los precipitados se resuspendieron suavemente con pipeta en NaCl 0,9 %. La última etapa se repitió dos veces más para lavar las células y eliminar los restos de antibióticos.

Se prepararon mezclas de conjugación siguiendo las siguientes relaciones (receptora / movilizadora / donadora): (2/1/1), (4/1/1) y (8/1/1) en las conjugaciones positivas; (4/1/0) como control negativo donadora; (4/0/1) como control negativo movilizadora; y (0/1/1) como control negativo receptora. Se dispusieron volúmenes equivalentes de las diferentes mezclas (en relación a la cantidad de células receptoras) sobre filtros estériles de 0,22  $\mu$ m (MSI-AcetatePlus, Osmonics) colocados sobre placas con medio TY sólido (bactoagar 15 g/l) y se incubaron a 28° C durante 12 horas para completar la conjugación.

Se recogieron los filtros bajo condiciones de esterilidad e introdujeron en tubos falcon con 3 ml de NaCl 0,9 %. Se agitaron los tubos mediante vortex para desprender las células de los filtros y se recogieron las mezclas conjugadas. Se sembraron alícuotas de las mezclas en placas TY sólido (bactoagar 15 g/l) con tetraciclina (20  $\mu$ g/ml) y rifampicina (100  $\mu$ g/ml) para seleccionar únicamente las bacterias conjugadas de *Sinorhizobium meliloti* 2011 Rifampicina<sup>R</sup> que contienen los plásmidos pFAJ1709 y pFAJ1709-Fld.

### 3.4. Transformación de *Pseudomonas fluorescens*

Se prepararon bacterias de *Pseudomonas fluorescens* aur6 Rifampicina<sup>R</sup> para transformarlas mediante conjugación triparental con los plásmidos pFAJ1709 y pFAJ1709-Fld (Tabla 2.3).

Se siguió el protocolo descrito para *Sinorhizobium meliloti* (Materiales y Métodos 3.3) con algunas modificaciones. Se realizaron las mezclas de conjugación siguiendo las siguientes relaciones (receptora / movilizadora / donadora): (2/1/1), (6/1/1) y (8/1/1) en las conjugaciones positivas; (6/1/0) como control negativo donadora; (6/0/1) como control negativo movilizadora; y (0/1/1) como control negativo receptora.

### 3.5. Transformación de *Medicago truncatula*

Se utilizaron plantas de la línea R108-1 (c3) (Trinh *et al.*, 1998) que procede de la línea R108-1 (Hoffmann *et al.*, 1997) tras sufrir 3 ciclos sucesivos de regeneración *in vitro*, para transformar la leguminosa modelo *Medicago truncatula* (Gaertn.) debido a su elevada respuesta a la transformación y cultivo *in vitro*. Se realizó según lo descrito por Trinh *et al.* (1998) (Fig.2.4).

#### 3.5.1. Preparación de *Agrobacterium tumefaciens*

Se preparó un preinóculo a partir de una colonia aislada de *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 / pFLD en 2 ml de medio YEB con kanamicina (50  $\mu$ g/ml), se incubó a 30° C y 200 rpm durante la noche. Se diluyó el preinóculo 1:100 en 100 ml de medio YEB con kanamicina (50  $\mu$ g/ml), y se incubó hasta alcanzar una  $DO_{600}$  de 0,6. Se centrifugó el cultivo a 5000 rpm a 4° C durante 10 minutos, se eliminó todo el sobrenadante y el sedimento se resuspendió suavemente con pipeta en 100 ml de medio SH3a (SHMab en Trinh *et al.*, 1998) (Tabla 2.5).

### 3.5.2. Preparación de explantes de *Medicago truncatula*

Se eligieron plantas de *Medicago truncatula* de 3-5 semanas crecidas en macetas de plástico con mezcla de vermiculita (Asfaltex) y arena calibrada n° 3 (2:1) bajo condiciones controladas. Se seleccionaron trifolios de textura suave y aspecto saludable. Las hojas seleccionadas para los explantes se sumergieron en una solución Tween 20 0,1 % durante 10 minutos en agitación suave y se lavaron varias veces con agua bidestilada estéril para eliminar los restos de detergente. Se esterilizaron con hipoclorito sódico (17% del comercial Auchan) durante 15 minutos en agitación suave y se lavaron varias veces con agua bidestilada estéril.

Tabla 2.5. Medios utilizados en la transformación

	<b>SH3a</b>	<b>SH9</b>
N6 major	100 ml/l	100 ml/l
SH minor	1 ml/l	1 ml/l
SH vit	1 ml/l	1 ml/l
EDFS	140 mg/l	140 mg/l
Mio-inositol	100 mg/l	100 mg/l
Sacarosa	30 g/l	20 g/l
2,4 D	5 mg/l	-
BAP	0,5 mg/l	-

N6 major (Chu *et al.*, 1978):  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1,85 g/l;  $\text{KNO}_3$  28,3 g/l;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  4,63 g/l;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  1,66 g/l;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  4 g/l

SH minor (Shenck y Hildebrant, 1972):  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  1 g/l;  $\text{H}_3\text{BO}_3$  500 mg/l; KI 100 mg/l;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  100 mg/l;  $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  10 mg/l;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  20 mg/l;  $\text{CoCl}_2$  10 mg/l

SH vit (Shenck y Hildebrant, 1972): ácido nicotínico 5 g/l; Tiamina HCl (vitamina B1) 5 g/l; Piridoxina HCl (vitamina B6) 5 g/l

### 3.5.3. Transformación

Para favorecer la infección de los explantes por *Agrobacterium*, se les aplicó vacío (760 mm Hg) durante 15 minutos y se mantuvieron en agitación suave (100 rpm) durante 2 horas. Tras ese tiempo, en condiciones de esterilidad, los explantes se lavaron en una placa petri con medio SH3a, se secaron brevemente sobre papel de filtro estéril y se pasaron a placas con medio SH3a sólido (6 g/l Agar HP 696; Kalys, St Ismier, Francia) suplementado con acetosiringona (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) (9,81 mg/l). Se dispusieron 5-6 explantes en cada placa apoyados sobre el envés y se mantuvieron durante 2 días en oscuridad a 24° C para la cocultivación de los explantes con *Agrobacterium*.

Las hojas esterilizadas se dispusieron en una placa petri que contenía 10 ml del cultivo de *A. tumefaciens* resuspendido en medio SH3a. Con ayuda de bisturí, se eliminaron los bordes manteniendo la zona central de la hoja.



### 3.5.4. Selección y regeneración

Trascurridos los tiempos de cocultivación, se procedió a la eliminación del *Agrobacterium* y al cultivo *in vitro* de los explantes transformados. Se transfirieron los explantes a placas de SH3a sólido (6 g/L Agar HP 696, Kalys) suplementadas con el antibiótico comercial Augmentine (amoxicilina : ácido clavulónico: 1 g /200 mg; SmithKline Beecham) (800 mg/l) para frenar el crecimiento de *Agrobacterium* y con el herbicida selectivo Basta (Hoechst Schering AgrEvo GMBH, Frankfurt/Main, Alemania) (3 mg/l) para seleccionar únicamente aquellas células que habían sido transformadas. Las placas se mantuvieron en oscuridad a 24° C durante 5-6 semanas y se renovaron las placas a las 2-3 semanas transfiriendo el material. Para inducir la embriogénesis somática, los callos se pasaron a un medio libre de hormonas y en presencia de luz. Se transfirieron a medio SH9 (SHM2 en Trinh *et al.*, 1998) (Tabla 2.5) sólido (7 g/l Agar HP 696, Kalys) suplementado con el herbicida selectivo Basta durante 2 semanas a 24° C con 12 horas de fotoperiodo. Seguidamente, se transfirieron a medio sólido SH9/2 (medio SH9 diluido a la mitad) y se mantuvieron bajo las mismas condiciones 2-3 semanas más, hasta que se regeneraron plántulas completas. Las plántulas se pasaron a macetas de plástico con mezcla de vermiculita (Asfaltex) arena calibrada n° 3 (2:1), se cubrieron con plástico durante la primera semana y crecieron en condiciones controladas de humedad (50 % de humedad relativa) y temperatura (23° C durante el día y 15° C durante la noche) con un fotoperiodo de 14 horas de luz/día.

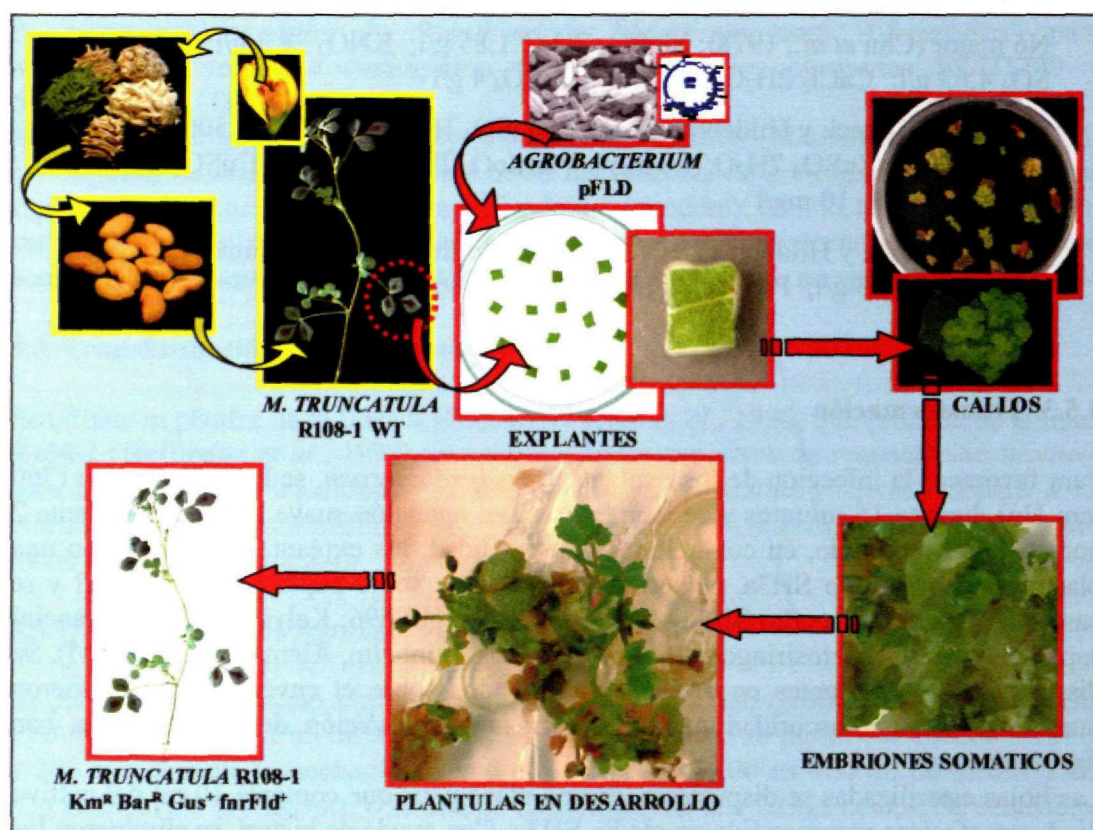


Figura 2.4. **Transformación.** Construcción de plantas transgénicas de *Medicago truncatula* expresando flavodoxina, mediante infección por *Agrobacterium tumefaciens*.



## 4. Técnicas bioquímicas

### 4.1. Electroforesis e inmunodetección de proteínas

#### 4.1.1. Extracción de proteínas

Se extrajeron proteínas totales de hojas de *Medicago truncatula*. El material se pulverizó en un mortero en nitrógeno líquido y se homogeneizó en la solución tamponadora de extracción (Tris-HCl 100 mM pH 8, EDTA 1 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 1,7 mM, PMSF 2 mM). Los homogeneizados se centrifugaron durante 30 minutos a 4° C y 15.000 rpm y se recogieron los sobrenadantes.

Se extrajeron proteínas totales de *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens* y *Sinorhizobium meliloti* (bacterias en vida libre y bacteroides aislados de nódulos de *Medicago sativa*). Para la extracción de las proteínas de bacterias, se centrifugaron cultivos en fase estacionaria durante 10 minutos a 4° C y 8.000 rpm. Las bacterias sedimentadas se resuspendieron suavemente con pipeta en el tampón de lavado (fosfato potásico 50 mM pH 7,5, sacarosa 300 mM,  $MgSO_4$  2 mM) y se centrifugaron durante 10 minutos a 4° C y 8.000 rpm. Las bacterias lavadas se resuspendieron en el tampón de sonicación (fosfato potásico 20 mM pH 7,5, EDTA 1 mM,  $MgCl_2$  5 mM, glicerol 1 M, DTT 1 mM). Las muestras se sonicaron con 25 pulsos de 50 segundos al 60% de intensidad en un sonicador Vibra-Cell VC-375 (Sonics and Materials, Danbury, USA). Las bacterias sonicadas se centrifugaron durante 15 minutos a 4° C y 15.000 rpm y se recogieron los sobrenadantes. Para la extracción de los bacteroides de nódulos de plantas de *Medicago sativa* inoculadas con *Sinorhizobium meliloti*, se homogeneizaron los nódulos en un mortero en tampón de extracción (fosfato potásico 50 mM pH 7,5, DTT 1 mM, PVP 10 % p/p, leupeptin 5  $\mu$ g/ml, pepstatin 5  $\mu$ g/ml) durante 5 minutos a 4° C. Se centrifugaron los homogeneizados durante 10 minutos a 4° C y 2.000 rpm. Se resuspendió el precipitado en tampón de lavado y se continuó la extracción de proteínas. Se estimó la concentración de proteínas de acuerdo al método Bradford (1976) utilizando seroalbumina bovina como estándar y siguiendo las instrucciones del fabricante (Bradford assay, Bio-Rad).

#### 4.1.2. Electroforesis de proteínas y transferencia a membrana

Las proteínas se separaron en geles de poliacrilamida con urea 6 M, en condiciones desnaturalizantes con SDS (Laemmli, 1970). Los geles separadores (15% solución acrilamida/bis, BIO-RAD) se realizaron en tampón separador (Tris-HCl 1,5M, pH 8,8; SDS 2,5 % p/v) que contenía persulfato amónico 0,5 % (p/v) y TEMED 0,125 % (v/v). Los geles concentradores (4,5 % solución acrilamida/bis, BIO-RAD) se realizaron en tampón concentrador (Tris-HCl 0,5M, pH 6,8; SDS 2,5 % p/v) que contenía persulfato amónico 0,5 % (p/v) y TEMED 0,2 % (v/v).

Las muestras se mezclaron con el tampón de carga 1x (tampón de carga 6x: tampón concentrador 2 ml; SDS 0,6 g; Urea 4,8 g; glicerol 5 ml; DTT 0,15 g; azul de bromofenol 0,1 % p/v), se desnaturalizaron (5 minutos a 100° C) y se separaron electroforéticamente en tampón de electroforesis (tampón de electroforesis 10x: Tris-HCl 250 mM; Glicina 1,92 M; SDS 1 % p/v; pH 8,3). La electroforesis se llevó a cabo aplicando un voltaje de 180V durante 80-100 minutos en un sistema Mini Protean (BIO-RAD). En cada electroforesis las muestras se cargaron por duplicado; uno de los geles se utilizó como control de carga y el otro se usó para la transferencia y posterior inmunodetección. El gel de control de carga se tiñó durante 60 minutos en agitación en



Azul de Coomasie (ácido tricloroacético 50 %; etanol 20%; Coomasie brilliant blue R-250, Sigma, 0,5% p/v). Se lavó repetidas veces en agitación con solución destefidora (metanol 25%; ácido acético 16,6 %) hasta la desaparición del color azul residual.

Para la inmunodetección se transfirieron las proteínas a una membrana de nitrocelulosa de 0,45  $\mu\text{m}$  (BIO-RAD) mediante electroforesis en sistema húmedo. Se aplicó un voltaje de 100V durante 50-60 minutos en tampón de transferencia (Tris-HCl 25mM; glicina 383 mM; metanol 20 %).

#### 4.1.3. Inmunodetección de flavodoxina

La detección de flavodoxina se llevó a cabo mediante inmunodetección indirecta. Se utilizó el anticuerpo policlonal anti-flavodoxina obtenido en conejo (Fillat *et al.*, 1991) y como anticuerpo secundario, se empleó anti IgG de conejo conjugado a fosfatasa alcalina obtenido en cabra (Sigma). La membrana se incubó durante 60 minutos en agitación suave en la solución de bloqueo [PBS 1x (PBS 10x: NaCl 8 %; KCl 27 mM;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  100 mM;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  18 mM; pH 7,4); leche desnatada en polvo 5% p/v, Molico]. A continuación se incubó la membrana con el anticuerpo primario (dilución 1:750 en solución de bloqueo) durante 12 horas a temperatura ambiente y agitación suave. Seguidamente se hicieron cuatro lavados con PBS 1x, dos de 5 minutos y dos de 10 minutos. La membrana se incubó con el anticuerpo secundario (dilución 1:20000 en solución de bloqueo) durante 2 horas a temperatura ambiente y agitación suave. Seguidamente se hicieron dos lavados de 10 minutos con PBS 1x y dos lavados de 5 minutos con TBS1 1x (TBS 10x: Tris-HCl 100 mM; NaCl 9 %; azida sódica 0,2 %). Para el revelado, la membrana se equilibró previamente en tampón Tris-HCl 100 mM pH 9,6 durante 10 minutos a temperatura ambiente en agitación suave, y se incubó en la solución de revelado [9 ml Tris HCl 100 mM, pH 9,6; 1 ml NBT (1mg/ml); 100  $\mu\text{l}$  BCIP (1mg/ml); 40  $\mu\text{l}$   $\text{MgCl}_2$  1M] a temperatura ambiente, sin agitación y en oscuridad hasta que apareció el precipitado coloreado. La reacción se paró con agua destilada.

#### 4.2. Metabolismo oxidativo en nódulos. Actividades enzimáticas y cuantificación de metabolitos antioxidantes

##### 4.2.1. Preparación de los extractos

Los nódulos fueron pulverizados en mortero con nitrógeno líquido y homogeneizados en el medio de extracción correspondiente.

Para la actividad catalasa (EC 1.11.1.6), superóxido dismutasa (EC 1.15.1.1), ascorbato peroxidasa (EC 1.11.1.11), monodehidroascorbato reductasa (EC 1.6.5.4), dehidroascorbato reductasa (EC 1.8.5.1) y glutathion reductasa (EC 1.6.4.2), las muestras se homogeneizaron en tampón fosfato potásico 50 mM (pH 7,8), EDTA 0,1 mM, polivinilpirrolidona (PVP-10) 1% p/v, Triton X-100 0,1% v/v. Para la determinación de glutathion, las muestras se homogeneizaron en tampón fosfato sódico 100 mM (pH 7,6), EDTA 5 mM, ácido sulfosalicílico 5 % p/v.

Los homogeneizados se centrifugaron durante 30 minutos a 4° C y 15.000 rpm y se recogieron los sobrenadantes. Se determinó el peso seco de los nódulos y se estimó la concentración de proteínas de acuerdo al método Bradford (1976) utilizando seroalbumina bovina como estándar y siguiendo las instrucciones del fabricante (Bradford assay, Bio-Rad).

Se utilizó un espectrofotómetro termostatzado Beckman DU-640, High Performance Temperature Controller (Beckman Coulter, Krefeld, Alemania) para las determinaciones enzimáticas y las cuantificaciones de los metabolitos.

#### 4.2.2. Actividad catalasa

Para la determinación de la actividad catalasa se siguió en el método espectrofotométrico descrito por Aebi (1984) basado en la disminución de la absorbancia a 240 nm debida a la descomposición del  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

La mezcla de reacción se llevó a cabo en un volumen final de 0,5 ml que contenía tampón fosfato potásico 50 mM (pH 7,8),  $\text{H}_2\text{O}_2$  12 mM y 10  $\mu\text{l}$  del extracto (20-30  $\mu\text{g}$  proteína). Se comprobó la inhibición de la actividad catalasa en los extractos hervidos y con la adición de KCN 1 mM ó de aminotriazole 5 mM.

La determinación se inició con la adición de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y se registró la disminución de la absorbancia a 240 nm, a 25° C cada 10 segundos, durante 1 minuto según la siguiente reacción:



La actividad enzimática, expresada como  $\mu\text{moles}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  oxidado  $\text{min}^{-1} \text{ml}^{-1}$ , se calculó a partir de la cinética de reacción y del coeficiente de extinción molar para el  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 240 nm ( $\epsilon = 43,6 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ). La actividad específica se expresó como  $\mu\text{moles}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  oxidado  $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína ó como  $\mu\text{moles}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  oxidado  $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$  de peso seco de nódulo.

#### 4.2.3. Actividad superóxido dismutasa

La actividad superóxido dismutasa (SOD) se estimó en base a la inhibición de la tasa de reducción del citocromo c por los radicales superóxido generados en el sistema xantina – xantina oxidasa. Se empleó el método espectrofotométrico descrito por McCord y Fridovich (1969) para el seguimiento del aumento de la absorbancia a 550 nm debida a la reducción del citocromo férrico c. La inhibición de la tasa de reducción del citocromo c viene definida por la actividad SOD en la competencia por el radical superóxido según las siguientes reacciones:



La mezcla de reacción se llevó a cabo en un volumen final de 1 ml que contenía tampón fosfato potásico 50 mM (pH 7,8), EDTA 0,1 mM, xantina 0,1 mM, citocromo férrico c 14  $\mu\text{M}$  y 16  $\mu\text{l}$  de solución de enzima (20  $\mu\text{l}$  xantina oxidasa en 800  $\mu\text{l}$  tampón fosfato



potásico 50 mM, pH 7,8). Se incluyó KCN 5  $\mu$ M para inhibir la citocromo c oxidasa mitocondrial. En la reacción problema se añadieron 30  $\mu$ l del extracto (40-60  $\mu$ g proteína). Se comprobó la inhibición de la actividad SOD en los extractos hervidos.

La determinación se inició con la adición de la solución de enzima generadora de radicales superóxido y se registró el aumento de la absorbancia a 550 nm, a 25° C cada 10 segundos, durante 1 minuto en las reacciones control y problema.

La unidad de actividad SOD se define como la cantidad de enzima necesaria para producir una inhibición del 50 % en la velocidad inicial de reducción del citocromo férrico c en un sistema acoplado. Se calculó la actividad enzimática expresada como unidades/ml según:

$$\text{Unidades/ml} = \frac{\% \text{ inhibición}}{50} \cdot f \quad ; \quad \% \text{ inhibición} = \frac{\Delta A_{550\text{nm}}/\text{min} (\text{control}) - \Delta A_{550\text{nm}}/\text{min} (\text{problema})}{\Delta A_{550\text{nm}}/\text{min} (\text{control})}$$

donde  $f$  es el factor de dilución empleado y  $v$  es el volumen de extracto, expresado en ml.

La actividad específica se expresó como unidades/mg de proteína ó como unidades/g de peso seco de nódulo.

#### 4.2.4. Actividad ascorbato peroxidasa

La determinación de la actividad ascorbato peroxidasa (APX) se realizó siguiendo el método espectrofotométrico descrito por Asada (1984) basado en la disminución de la absorbancia a 290 nm debida a la oxidación del ácido ascórbico.

La mezcla de reacción se llevó a cabo en un volumen final de 1 ml que contenía tampón HEPES-NaOH 50 mM (pH 7,6), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,3 mM, ascorbato 0,2 mM y 30  $\mu$ l del extracto (35-50  $\mu$ g proteína). Se utilizaron varios controles para corregir posibles oxidaciones del ácido ascórbico independientes de la actividad APX: extracto hervido, adicción de KCN 1 mM, adición de ácido p-cloromercurifenilsulfónico 0,5 mM, ausencia de extracto y ausencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

La determinación se inició con la adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y se registró la disminución de la absorbancia a 290 nm, a 25° C cada 10 segundos, durante 1 minuto según la siguiente reacción:



La actividad enzimática, expresada como nmoles de ácido ascórbico oxidado  $\text{min}^{-1} \text{ml}^{-1}$ , se calculó a partir de la cinética de reacción y del coeficiente de extinción molar para el ácido ascórbico a 290 nm ( $\epsilon = 2,8 \text{ mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ). La actividad específica se expresó como nmoles de ácido ascórbico oxidado  $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína ó como nmoles de ácido ascórbico oxidado  $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$  de peso seco de nódulo.

#### 4.2.5. Actividad monodehidroascorbato reductasa

La actividad monodehidroascorbato reductasa (MDHAR) se determinó siguiendo el descenso de absorbancia a 340 nm debida a la oxidación del NADH (Dalton *et al.*, 1992).

La mezcla de reacción se llevó a cabo en un volumen final de 1 ml que contenía tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7,8), ascorbato 1 mM, ascorbato oxidasa 0,5 unidades y 30  $\mu$ l del extracto (35-50  $\mu$ g proteína). Se utilizó una mezcla de ácido ascórbico y ascorbato oxidasa (EC 1.10.3.3) como sistema generador del radical monodehidroascorbato. La ausencia de este sistema permitió la corrección de oxidaciones del NADH independientes de MDHAR.

El ensayo se inició con la adición del NADH y se registró la disminución de la absorbancia a 340 nm, a 25° C cada 10 segundos, durante 1 minuto según la siguiente reacción:



La actividad enzimática, expresada como nmoles de NADH oxidado  $\text{min}^{-1} \text{ml}^{-1}$ , se calculó a partir de la cinética de reacción y del coeficiente de extinción molar para el NADH a 340 nm ( $\epsilon = 6,22 \text{ mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ). La actividad específica se expresó como nmoles de NADH oxidado  $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína ó como nmoles de NADH oxidado  $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$  de peso seco de nódulo.

#### 4.2.6. Actividad dehidroascorbato reductasa

La actividad dehidroascorbato reductasa (DHAR) se determinó mediante la medición del incremento de absorbancia a 265 nm (Nakano y Asada, 1981) debida a la formación de ascorbato a partir de dehidroascorbato (DHA).

Se utilizó un espectrofotómetro termostatzado Beckman Coulter DU-640, High Performance Temperature Controller. La mezcla de reacción se llevó a cabo en un volumen final de 0,5 ml que contenía tampón fosfato potásico 50 mM (pH 6,5), EDTA 0,1 mM, glutation reducido (GSH) 50 mM, DHA 5mM y 20  $\mu$ l del extracto (25-35  $\mu$ g proteína).

La determinación se inició con la adición de DHA y se registró el aumento de la absorbancia a 265 nm, a 25° C cada 10 segundos, durante 1 minuto según la siguiente reacción:



La actividad enzimática, expresada como nmoles de ácido ascórbico  $\text{min}^{-1} \text{ml}^{-1}$ , se calculó a partir de la cinética de reacción y del coeficiente de extinción molar para el ácido ascórbico a 265 nm ( $\epsilon = 14 \text{ mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ). Debido a la absorbancia del glutation oxidado (GSSG) en esta longitud de onda, se aplicó un factor de corrección (0,98) en los incrementos observados (Hernández-Jiménez, 1998). La actividad específica se expresó como nmoles de ácido ascórbico  $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína ó como nmoles de ácido ascórbico  $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$  de peso seco de nódulo.

#### 4.2.7. Actividad glutation reductasa

La actividad glutation reductasa (GR) se determinó siguiendo el descenso de absorbancia a 340 nm debida a la oxidación del NADPH (Dalton *et al.*, 1986).



La mezcla de reacción se llevó a cabo en un volumen final de 1 ml que contenía tampón HEPES-NaOH 100 mM (pH 7,8), EDTA 0,1 mM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, GSSG 1 mM, NADPH 0,1 mM y 40 µl del extracto (50-75 µg proteína).

La determinación se inició con la adición de NADPH y se registró la disminución de la absorbancia a 340 nm, a 25° C cada 10 segundos, durante 1 minuto según la siguiente reacción:



La actividad enzimática, expresada como nmoles de NADPH oxidado min<sup>-1</sup> ml<sup>-1</sup>, se calculó a partir de la cinética de reacción y del coeficiente de extinción molar para el NADPH a 340 nm ( $\epsilon = 6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). La actividad específica se expresó como nmoles de NADPH oxidado min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína ó como nmoles de NADPH oxidado min<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> de peso seco de nódulo.

#### 4.2.8. Determinación de glutat ion

El contenido de glutat ion se determinó mediante el sistema de reciclado de la glutat ion reductasa y el reactivo de Ellman (5,5' ditio-bis- (ácido 2-nitrobenzoico), DTNB) desarrollado por Anderson (1985) y adaptado por Floreani *et al.* (1997). El glutat ion reducido (GSH) y el DTNB reaccionan generando el producto coloreado, ácido 2-nitro-5-tiobenzoico (TNB) y glutat ion oxidado (GSSG). El GSSG es reducido a GSH en presencia de NADPH mediante la glutat ion reductasa. Todo ello según las siguientes reacciones:



La tasa de formación de TNB que es proporcional a la cantidad de GSH y GSSG, se siguió espectrofotométricamente mediante el aumento de absorbancia a 412 nm.

Para la determinación del glutat ion total (GSH+GSSG), la mezcla de reacción se llevó a cabo en un volumen final de 1 ml que contenía tampón fosfato sódico 50 mM (pH 7,6), EDTA 5 mM, tampón fosfato potásico 100 mM (pH 7,6) para la neutralización, DTNB 1,5 mM, NADPH 0,3 mM, glutat ion reductasa (0,01 mg) y 50 µl de muestra (40-80 µg proteína). La determinación se inició con la adición de NADPH y se registró el aumento de la absorbancia a 412 nm, a 25° C cada 10 segundos, durante 1 minuto. En la determinación de GSSG después de la neutralización de la muestra, se añadieron 4 µl de 2-vinil piridina (2-VP) para la eliminación del GSH y se dejó durante 1 hora. Se hicieron dos lavados de la muestra con dietileter y se continuó la determinación siguiendo el mismo procedimiento que para la medida de glutat ion total.

El GSH se determinó como la diferencia entre el contenido de glutat ion total y el contenido de GSSG. La cantidad de glutat ion, expresada como nmoles ml<sup>-1</sup>, se calculó a partir de una curva patrón de GSH. La cantidad específica se expresó como nmoles mg<sup>-1</sup> de proteína ó como nmoles gr<sup>-1</sup> de peso seco de nódulo.

### 4.3. Actividades enzimáticas del metabolismo del carbono

#### 4.3.1. Preparación de los extractos

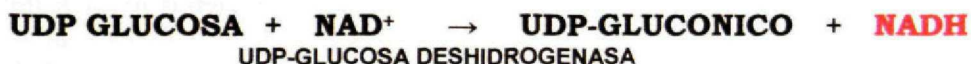
Los nódulos fueron pulverizados en mortero en presencia de nitrógeno líquido y homogeneizados en el medio de extracción correspondiente.

Para la actividad sacarosa sintasa (EC 2.4.1.13), las muestras se homogeneizaron en tampón fosfato potásico 50 mM (pH 8), EDTA 1 mM, polivinilpirrolidona (PVP) 33% p/p fresco de la muestra, etilenglicol 20% (v/v). Para la actividad fosfoenolpiruvato carboxilasa (EC 4.1.1.31), las muestras se homogeneizaron en tampón Tris-HCl 50 mM (pH 8), Mg<sub>2</sub>Cl 10 mM, ditiotretol 1 mM, polivinilpirrolidona (PVP) 30% (p/p fresco de la muestra), etilenglicol 25% (v/v).

Los homogeneizados se centrifugaron durante 30 minutos a 4° C y 15.000 rpm y se recogieron los sobrenadantes. Se determinó el peso seco de los nódulos y se estimó la concentración de proteínas de acuerdo al método Bradford (1976) utilizando seroalbumina bovina como estándar y siguiendo las instrucciones del fabricante (Bradford assay, Bio-Rad).

#### 4.3.2. Actividad sacarosa sintasa

Se determinó la actividad sacarosa sintasa siguiendo el incremento de absorbancia a 340 nm debida a la reducción del NAD<sup>+</sup> (Morel y Copelan, 1985). La enzima sacarosa sintasa hidroliza la sacarosa en presencia de uridín difosfato (UDP), produciendo uridín difosfato glucosa (UDP-glucosa). La UDP-glucosa se oxida en presencia de NAD<sup>+</sup> mediante la UDP-glucosa deshidrogenasa (EC 1.1.1.22) produciendo NADH. Según las siguientes reacciones:



La mezcla de reacción se llevó a cabo en un volumen final de 1 ml que contenía tampón Bicina-KOH 100 mM (pH 8,5), sacarosa 0,1 M, UDP 2 mM, UDP-glucosa deshidrogenasa 250 µg, NAD<sup>+</sup> 1,5 mM y 50 µl del extracto (45-70 µg proteína). La determinación se inició con la adición del extracto y se siguió el incremento de absorbancia a 340 nm, a 25° C cada 10 segundos, durante 1 minuto.

La actividad enzimática, expresada como nmoles de NADH reducido min<sup>-1</sup> ml<sup>-1</sup>, se calculó a partir de la cinética de reacción y del coeficiente de extinción molar para el NADH a 340 nm ( $\epsilon = 6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). La actividad específica se expresó como nmoles de NADPH oxidado min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína ó como nmoles de NADPH oxidado min<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> de peso seco de nódulo.

#### 4.3.3. Actividad fosfoenolpiruvato carboxilasa

La actividad fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPc) se determinó siguiendo el descenso de absorbancia a 340 nm debida a la oxidación del NADH (Vandercammen *et al.*,



1989). La enzima PEPc cataliza la transformación del fosfoenolpiruvato (PEP) en oxalacetato (OAA). El OAA se reduce en presencia de NADH mediante la malato deshidrogenasa (EC 1.1.1.37). Según las siguientes reacciones:



La mezcla de reacción se llevó a cabo en un volumen final de 1 ml que contenía tampón Tris-HCl 50 mM (pH 8),  $\text{Mg}_2\text{Cl}$  10 mM, ditiotreitól 5 mM,  $\text{NaHCO}_3$  10 mM, fosfoenolpiruvato 2mM, NADH 1 mM, malato deshidrogenasa 5 unidades y 50  $\mu\text{l}$  del extracto (45-70  $\mu\text{g}$  proteína). La determinación se inició con la adicción del extracto y se siguió el descenso de absorbancia a 340 nm, a 25° C cada 10 segundos, durante 1 minuto.

La actividad enzimática, expresada como nmoles de NADH oxidado  $\text{min}^{-1} \text{ml}^{-1}$ , se calculó a partir de la cinética de reacción y del coeficiente de extinción molar para el NADPH a 340 nm ( $\epsilon = 6,22 \text{ mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ). La actividad específica se expresó como nmoles de NADPH oxidado  $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína ó como nmoles de NADH oxidado  $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$  de peso seco de nódulo.

#### 4.4. Medida de la actividad nitrogenasa

La medida de la actividad nitrogenasa se determinó por el ensayo de reducción de acetileno (ARA) (Hardy *et al.*, 1968) según de Felipe *et al.* (1987). La parte radical de las plantas estudio se introdujo en un tubo de vidrio de 100 ml de volumen que se cerró herméticamente. Se igualaron las presiones exterior e interior. Seguidamente, se extrajeron 10 ml de aire y se introdujeron 10 ml de acetileno. Los tubos se incubaron a 25° C durante 2 horas y a continuación se extrajeron muestras de 0,5 ml por duplicado. La medida de reducción de acetileno se determinó en un cromatógrafo de gases Perkin-Elmer 8310, equipado con una columna de acero con Porapak-R, empleando nitrógeno (N-50) como gas portador, a una velocidad de flujo de 50 ml/minuto. La medición de la reducción de acetileno mediante el uso de sistemas cerrados conlleva una cierta disminución de la actividad nitrogenasa inducida por acetileno (Minchin *et al.*, 1983; Sinclair y Serraj, 1995). No obstante el presente método resulta útil en estudios con propósitos comparativos, especialmente cuando el tiempo de ensayo es corto.

Se obtuvo la cantidad de acetileno ( $\text{C}_2\text{H}_2$ ) y etileno ( $\text{C}_2\text{H}_4$ ) presente en la muestra y se determinó el volumen de aire presente en el interior del tubo. Se estimó la actividad nitrogenasa como nmoles de etileno ( $\text{C}_2\text{H}_4$ ) producidos.

#### 4.5. Detección histológica de actividad GUS

En cada ensayo se tomaron varios trifolios por planta. Se aplicaron incisiones y cortes a las hojas para facilitar la penetración del sustrato de la reacción. Se embebíó el tejido vegetal en la solución de detección ( $\text{NaPO}_4$  100mM, pH 7; cianida férrica 0,5 mM; cianida ferrosa 0,1 mM; Tritón X-100 0,3%; 5-bromo-4-cloro- 3-indolil- $\beta$ -glucurónido (X-Gluc) 1 mg/ml), y se aplicó vacío (760 mm Hg) durante 30 minutos. Se incubó en



oscuridad a 37° C toda la noche. A continuación se practicaron varios lavados con etanol 70%, 3 de 30 minutos y 2 de 60 minutos. Se colocó el material vegetal sobre un porta y se observó a la lupa.

## 5. Técnicas de microscopía

### 5.1. Procesamiento de las muestras

#### 5.1.1. Inclusión en la resina acrílica LR White. Polimerización a 60° C

Se realizó un primer periodo de fijación de los nódulos (10-44 días de edad) con glutaraldehído 5% y formaldehído 4% en tampón cacodilato sódico 100 mM pH 7,4, sacarosa 5  $\mu$ M durante 2 horas a 4° C, tras haber realizado varios (2-5) periodos de degasificación de 1 minuto. Los nódulos de 44 días se seccionaron transversalmente en dos partes para facilitar la fijación del material. Seguidamente, se renovó el fijador para proceder al segundo periodo de fijación durante 1,5 horas a 4° C. Finalizada la fijación del material se realizaron tres lavados de 1 hora a 4° C en tampón cacodilato sacarosa. Se realizó una postfijación con tetróxido de osmio 1% en tampón cacodilato sacarosa durante 16 horas a 4° C. Tras el periodo de postfijación y previo a la deshidratación de las muestras, se realizaron dos nuevos lavados de 5 minutos a 4° C en tampón cacodilato sacarosa. Para la deshidratación se hicieron lavados en series de etanol creciente incluyendo en uno de ellos la tinción con uranilo. Concretamente, las tres primeras con etanol 30%, 50% y 70% de 10 minutos de duración a 4° C. Seguidamente un nuevo lavado con etanol 70% incluyendo uranilo al 1% para la tinción de las muestras durante 24 horas a 4° C. Y para terminar con la deshidratación, mas lavados con etanol (90%, 10 minutos 4° C; 96%, 30 minutos 4° C y 100%, 2 lavados de 1 hora 4° C).

A continuación se procedió a la infiltración progresiva de las muestras en la resina acrílica LR White (London Resin Company, Berkshire, UK). Se inició con una infiltración de 3 horas a 4° C en agitación suave con la resina 1:3 en etanol 100% seguida de una infiltración de 16 horas a 4° C en agitación suave con la resina 1:1 en etanol 100%. Posteriormente se continuó con una infiltración de 3 horas a 4° C en agitación suave con la resina 3:1 en etanol 100% seguida de una infiltración de 2 días a 4° C sin agitación con la resina pura. Finalmente se renovó la resina y se mantuvo la infiltración durante 24 horas más a 4° C en agitación suave. Para el encapsulado y polimerización se introdujeron las muestras individualmente en cápsulas de gelatina con resina fresca, se mantuvieron verticalmente a 60° C durante 24 horas y se dejaron enfriar lentamente.

#### 5.1.2. Inclusión en la resina acrílica LR White. Polimerización a -20° C con luz ultravioleta

Se realizó fijando las muestras en glutaraldehído 0,5% y formaldehído 1% según lo descrito en el apartado 5.1.1 de Materiales y Métodos exceptuando la postfijación con tetróxido de osmio y los posteriores lavados. Para el encapsulado y polimerización se introdujeron individualmente las muestras en cápsulas de gelatina con resina fresca, se mantuvieron verticalmente a -20° C con luz ultravioleta durante 2 días invirtiendo la incidencia de la luz ultravioleta sobre las cápsulas a las 24 horas.



### **5.1.3. Seccionamiento de las muestras**

Se tallaron los bloques y se seccionaron las muestras encapsuladas mediante ultramicrotomos REICHERT OMU2 y REICHERT ULTRACUT S (Leica, Vienna, Austria) equipados con cuchillas de diamante Diatome 45°.

### **5.2. Microscopia óptica de campo claro**

Para la visualización de las secciones (1-2  $\mu\text{m}$ ), se tiñeron con azul de toluidina al 1% (p/v) en bórax al 1% durante 4-8 minutos. La estructura de los nódulos se observó en un microscopio óptico Axiophot (Zeiss, Jena, Alemania) con sistema fotográfico integrado. Se utilizaron películas Kodak Gold 100 ASA.

### **5.3. Microscopia electrónica de transmisión. TEM**

Se realizaron cortes ultrafinos de ~70-90 nm de las muestras previamente seleccionados y se recogieron sobre rejillas de cobre de 200 ventanas. Se tiñeron con citrato de plomo (Reynolds, 1963) durante 1 minuto y se lavaron con agua bidestilada.

Se observaron las muestras con un microscopio electrónico STEM LEO910 (80-100 kV) (Zeiss) dotado con una cámara digital Gatan Bioscan (mod-792) para la adquisición de imágenes.

### **5.4. Microscopia electrónica de barrido a baja temperatura. Cryoscanning**

Los nódulos se adhirieron al portaobjetos para microscopia de barrido mediante pegamento Gurr (Compuesto O.C.T.; BDH, Sydney, Australia). A continuación, se introdujeron en una cámara de nitrógeno líquido Slush con una temperatura de -196° C y se produjo la rotura mecánica de la muestra. Seguidamente se deshidrataron a -90° C bajo condiciones de vacío y se sombrearon con oro. Finalmente, el portamuestras se transfirió a la cámara de observación del microscopio electrónico de barrido Digital Scanning Microscope DSM 960 de Zeiss. Se utilizaron los detectores de electrones secundarios y retrodispersados (B.S.E., Back Scattered Electrons) para la observación directa de las muestras.

## **6. Técnicas bioinformáticas**

### **6.1. Diseño y comprobación de oligonucleótidos**

Para el diseño de los oligonucleótidos se utilizó el programa **Primer3** (Rozen *et al.*, 2000). [http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)

Para las estimaciones de las temperaturas de hibridación **Oligocalculator** (Eugen Buehler). <http://www.lab314.com/genmol/oligocalc.htm>

Para las comprobaciones de complementariedad de parejas y autocomplementariedad de oligonucleótidos se utilizó el programa **OligoAnalyzer 3.0** (IDT SciTools). <http://207.32.43.70/biotools/oligocalc/oligocalc.asp>

### **6.2. Clonajes y digestiones enzimáticas**

Para la construcción de plásmidos, clonaciones y digestiones enzimáticas simuladas se utilizó el programa de libre acceso **NEBcutter v2.0** (New England Biolabs).

<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>. Para el análisis de las compatibilidades enzimáticas y el seguimiento de las digestiones enzimáticas se utilizó el programa **Tacg v2.38** (Center Molecular Biology Informatic).  
<http://www.cmbi.kun.nl/bioinf/tools/tacg/tacg2.form.html>

### 6.3. Consulta de secuencias y alineamientos

Para la búsqueda y consulta de secuencias de nucleótidos o aminoácidos se utilizaron las bases de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica de EE.UU. (National Center for Biotechnology Information, NCBI) y del Instituto Europeo de Bioinformática (European Bioinformatics Institute, EBI).

Para las comparaciones de secuencias se utilizaron diferentes programas o bases de datos: **Clustal W** (EBI). <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html>; **Blast: Blastn, Blastp y Blastx** (NCBI). <http://www.ncbi.nih.gov/BLAST/>; **Blast 2 Sequences** (NCBI). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html>; **MultAlign** (Corpet F., 1988). <http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/help.html>.

### 6.4. Consulta de enzimas metabólicas

Para la búsqueda de información sobre las diferentes rutas, enzimas, sustratos, productos, cinética y condiciones de reacción (temperatura, linealidad, inhibidores, etc.,) se utilizaron la base general de EXPASY. <http://www.expasy.org/enzyme/> y la base de enzimología BRENDA. <http://www.brenda.uni-koeln.de/index.php4>.

### 6.5. Consultas bibliográficas

Para la búsqueda y consulta de trabajos y publicaciones científicas se utilizaron las bases de datos de Centro Nacional de Información Biotecnológica de EE.UU (PubMed, NCBI). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=PubMed> ; la base de datos agrícola (Nacional Agricultural Library). <http://agricola.nal.usda.gov/> ; y la base de datos de Instituto Internacional de Estadística (ISI Web of Knowledge). <http://portal02.isiknowledge.com>.

## 7. Técnicas estadísticas

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo mediante el programa SPSS v. 13.0.1 (SPSS Inc.). Se trabajó con análisis de la varianza (ANOVA) de un factor y modelos lineales univariantes. Las diferencias significativas se determinaron por el test estadístico Mínima Diferencia Significativa o DMS (LSD; del inglés "Least Difference Significant"), por el test estadístico de Bonferroni (Bland y Altman, 1995) y por el test estadístico de Sidak (Sidak, 1967), ( $p \leq 0.05$ ).



## **Resultados**

---

## 1. Expresión de la proteína flavodoxina de *Anabaena variabilis* PCC 7119 en bacterias y bacteroides

### 1.1. Expresión de la proteína flavodoxina de *Anabaena variabilis* PCC 7119 en *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens* y *Sinorhizobium meliloti*

El vector pTrc99a constituye un sistema sencillo y eficaz para la expresión de flavodoxina en un modelo bacteriano clásico. Se dispuso del plásmido pTrc99a-Fld para expresar el gen de la flavodoxina en bacterias de *Escherichia coli*.

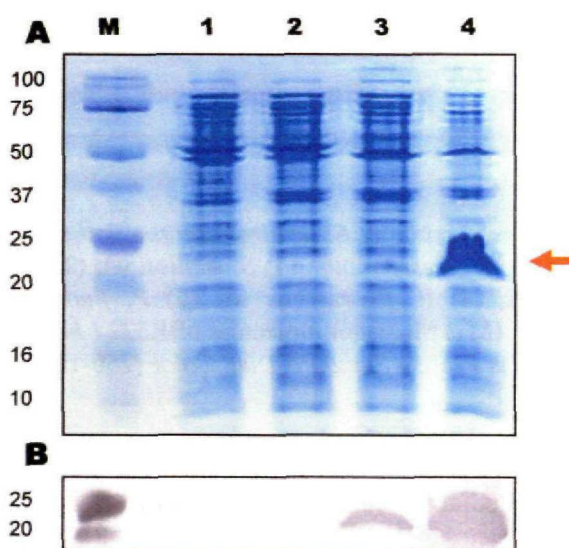


Figura 3.1. **Análisis de la expresión y acumulación de flavodoxina en *Escherichia coli*.** A) SDS-PAGE y B) Western blot e inmunodetección de flavodoxina (23 kDa,  $\rightarrow$ ). (1) *E. coli* wt; (2) *E. coli* / pTrc99a; (3) *E. coli* / pTrc99a-Fld; (4) *E. coli* / pTrc99a-Fld inducido por IPTG; (M) Marcador Precision Plus Protein Standard Dual Color (250-10 kDa) (BIO-RAD).

Para comprobar la expresión y acumulación de la proteína en las bacterias, se extrajeron proteínas totales y se realizó un western blot (Figura 3.1). Se inmunodetectó la expresión basal e inducida por IPTG de flavodoxina en las bacterias (Figura 3.1B). La acumulación de la proteína antioxidante de 23 kDa inmunodetectada en el western blot fue también evidente en el gel de proteínas teñido con azul de Coomassie (Figura 3.1A).

Para la expresión del gen de la flavodoxina en bacterias de *Pseudomonas fluorescens* y *Sinorhizobium meliloti* se utilizó el vector pFAJ1709. Para la construcción del plásmido pFAJ1709-Fld se amplificó por PCR el gen de la flavodoxina utilizando



como molde el plásmido pTrc99a-Fld (Materiales y Métodos 2.2). Se transformaron mediante conjugación bacterias de *Sinorhizobium meliloti* y *Pseudomonas fluorescens* (Materiales y Métodos 3.3 y 3.4) y posteriormente se comprobó la presencia del gen en las bacterias mediante amplificación por PCR del gen de flavodoxina de *Anabaena variabilis* PCC 7119 (Figura 3.2A).



Figura 3.2. **Expresión de flavodoxina en *Sinorhizobium meliloti* y *Pseudomonas fluorescens*.** A) Amplificación por PCR y B) Western blot. (1) *S. meliloti* wt; (2) *S. meliloti* / pFAJ1709; (3) *S. meliloti* / pFAJ1709-Fld; (4) *P. fluorescens* wt; (5) *P. fluorescens* / pFAJ1709; (6) *P. fluorescens* / pFAJ1709-Fld; (M<sub>A</sub>) Marcador molecular pBR322 / *Msp* I (New England Biolabs); (M<sub>B</sub>) Marcador Precision Plus Protein Standard Dual Color (250-10 kDa) (BIO-RAD).

La acumulación de flavodoxina en *Sinorhizobium meliloti* y *Pseudomonas fluorescens* se analizó mediante western blot (Figura 3.2B). Se inmunodetectó la expresión constitutiva de la flavodoxina en las bacterias portadoras del plásmido pFAJ1709-Fld.

## 1.2. Expresión de la proteína flavodoxina de *Anabaena variabilis* PCC 7119 en bacteroides de *Sinorhizobium meliloti*

Se utilizó el plásmido pFAJ1709-Fld para la expresión de flavodoxina en los bacteroides de *Sinorhizobium meliloti*. Se analizó el mantenimiento del plásmido así como la expresión y acumulación de flavodoxina en bacteroides de *Sinorhizobium meliloti*. Se aislaron bacteroides de los nódulos de plantas de *Medicago sativa* inoculadas con *Sinorhizobium meliloti*. Se comprobó la presencia del gen en los bacteroides aislados mediante amplificación por PCR del gen de flavodoxina de *Anabaena variabilis* PCC 7119 (Figura 3.3A). Para comprobar la acumulación de la proteína en los bacteroides, se extrajeron proteínas totales y se realizó un análisis

*western blot* (Figura 3.3B). Se inmunodetectó la flavodoxina en los bacteroides procedentes de las bacterias portadoras del plásmido pFAJ1709-Fld.

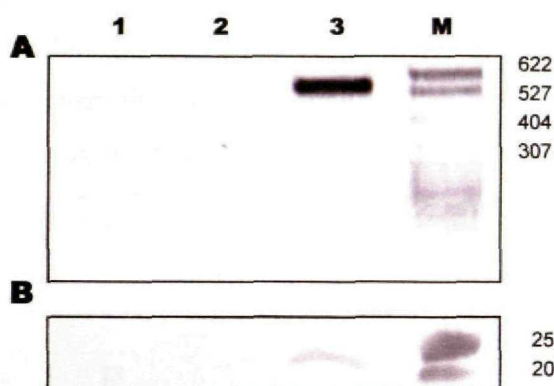


Figura 3.3. *Expresión de flavodoxina en bacteroides de Sinorhizobium meliloti*. **A)** Amplificación por PCR y **B)** *Western blot*. (1) *S. meliloti* wt; (2) *S. meliloti* / pFAJ1709; (3) *S. meliloti* / pFAJ1709-Fld; (**M<sub>A</sub>**) Marcador molecular pBR322 / *Msp* I (New England Biolabs) (**M<sub>B</sub>**) Marcador *Precision Plus Protein Standard Dual Color* (250-10 kDa) (BIO-RAD).



## 2. Efecto de la flavodoxina en bacterias sometidas a estrés oxidativo en vida libre

Se evaluó la capacidad protectora de la flavodoxina en bacterias en vida libre sometidas a estrés oxidativo causado por la presencia de peróxido de hidrógeno, metilviológeno y atrazina. Se realizaron ensayos de toxicidad en placa con diferentes concentraciones y se determinó la tolerancia a los diferentes agentes oxidantes en *Escherichia coli* (Figuras 3.4-3.6), *Pseudomonas fluorescens* (Figuras 3.7-3.9) y *Sinorhizobium meliloti* (Figuras 3.10-3.12).

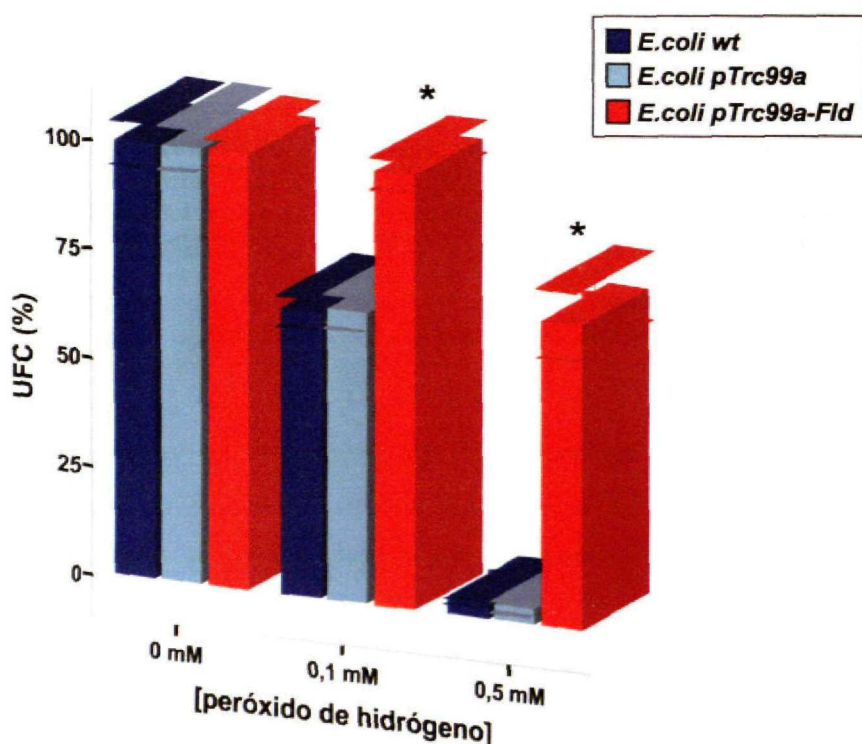


Figura 3.4. *Evaluación de la capacidad protectora de la flavodoxina frente al estrés oxidativo por peróxido de hidrógeno en Escherichia coli*. Efecto del peróxido de hidrógeno en placa (0,1mM y 0,5mM) sobre el crecimiento de *Escherichia coli* TG1 (wt, pTrc99a y pTrc99a-Fld). Se representa el % de unidades formadoras de colonias (UFC) a las 24 horas de crecimiento. Los datos proceden de 5 experimentos independientes. (\*) Diferencias significativas entre bacterias ( $p \leq 0,05$ ; LSD).

La presencia del plásmido (pTrc99a y pTrc99a-Fld) no produjo ninguna alteración en el crecimiento de las bacterias en ausencia de estrés oxidativo. Las bacterias de *Escherichia coli* que expresan flavodoxina (pTrc99a-Fld) fueron capaces de crecer en placa con una concentración 0,1 mM de peróxido de hidrógeno mientras que

el crecimiento de las bacterias control (wt y pTrc99a) se situó en torno al 60% (% de unidades formadoras de colonias, UFC) con respecto a las mismas bacterias crecidas en ausencia del agente oxidante. Cuando se trata de una concentración 0,5 mM de peróxido de hidrógeno, las bacterias control apenas fueron capaces de crecer (UFC<5%) mientras que el crecimiento de las bacterias que expresan la flavodoxina se situó sobre el 65% (Figura 3.4).

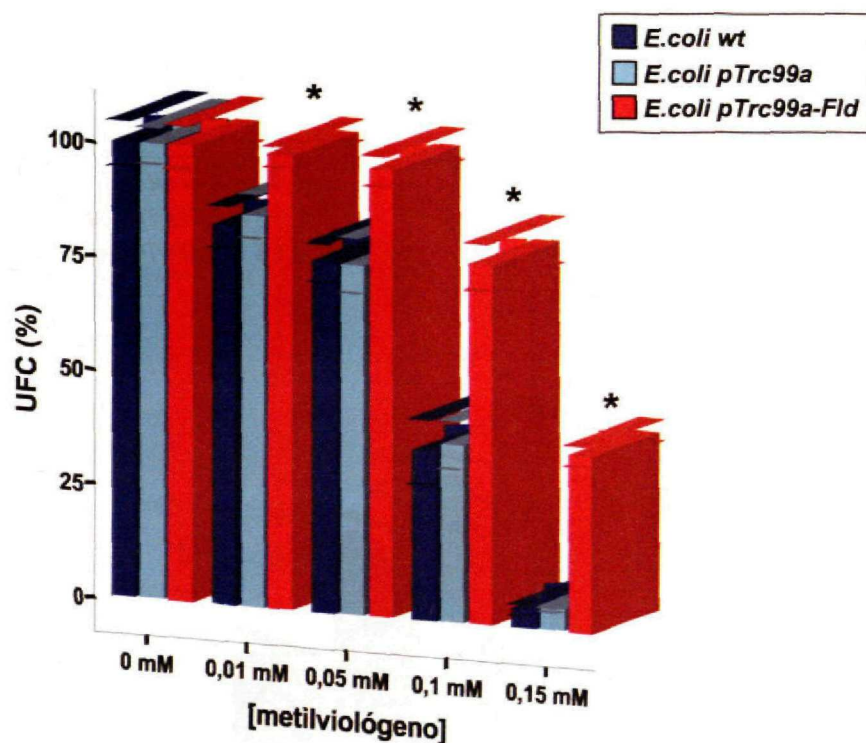


Figura 3.5. *Evaluación de la capacidad protectora de la flavodoxina frente al estrés oxidativo por metilviológeno en Escherichia coli*. Efecto del metilviológeno en placa (0,01mM, 0,05mM, 0,1mM y 0,15mM) sobre el crecimiento de *Escherichia coli* TG1 (wt, pTrc99a y pTrc99a-Fld). Se representa el % de unidades formadoras de colonias (UFC) a las 24 horas de crecimiento. Los datos proceden de 5 experimentos independientes. (\*) Diferencias significativas entre bacterias ( $p \leq 0,05$ ; LSD).

Cuando se utilizó metilviológeno como agente oxidante (Figura 3.5), las bacterias de *Escherichia coli* que expresan basalmente la flavodoxina presentaron una mayor tolerancia al estrés oxidativo que las bacterias control. A una concentración de 0,01 mM las diferencias en UFC con respecto a la ausencia de estrés oxidativo, fueron del 90% y 80% respectivamente, a una concentración de 0,1 mM las diferencias en UFC fueron más destacables, en torno al 77% y 37% respectivamente, y finalmente, a una



concentración de 0,15 mM, las bacterias control apenas fueron capaces de crecer (UFC<8%) mientras que el crecimiento de las bacterias que expresan la flavodoxina se situó alrededor del 40%.

La expresión de flavodoxina en *Escherichia coli* también confirió una mayor tolerancia al estrés oxidativo producido por atrazina (Figura 3.6). Con una concentración de 0,05 mM hubo un 55% de UFC frente al 45% de las bacterias control. A una concentración mayor, 0,2 mM, las diferencias en UFC fueron más destacables, en torno al 20% y 10% respectivamente.

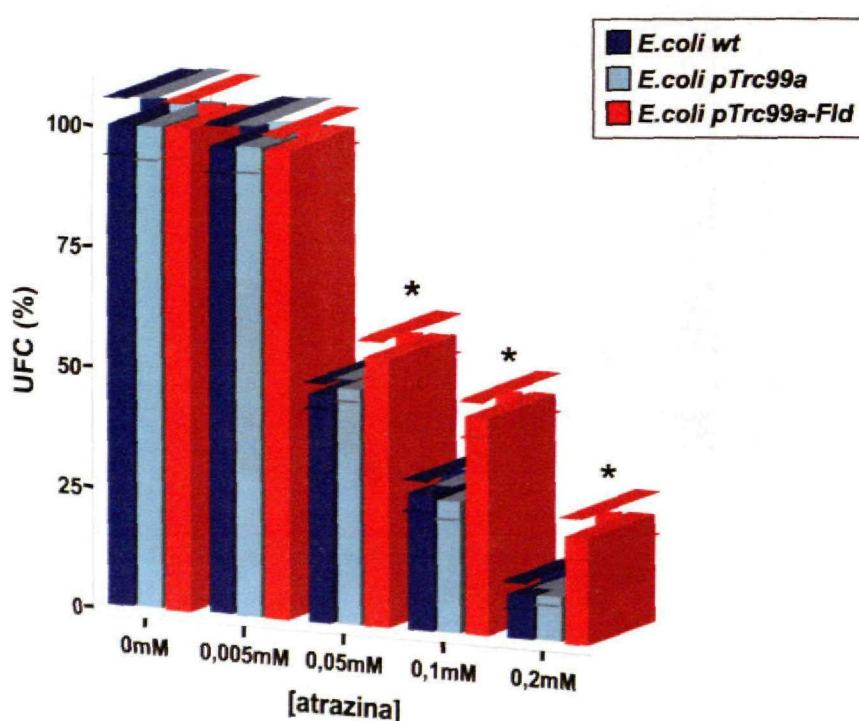


Figura 3.6. *Evaluación de la capacidad protectora de la flavodoxina frente al estrés oxidativo por atrazina en Escherichia coli*. Efecto de la atrazina en placa (0,005mM, 0,05mM, 0,1mM y 0,2mM) sobre el crecimiento de *Escherichia coli* TG1 (wt, pTrc99a y pTrc99a-Fld). Se representa el % de unidades formadoras de colonias (UFC) a las 24 horas de crecimiento. Los datos proceden de 5 experimentos independientes. (\*) Diferencias significativas entre bacterias ( $p \leq 0,05$ ; LSD).

La expresión inducida (+IPTG) de flavodoxina en *Escherichia coli* proporcionó una capacidad protectora similar frente al estrés oxidativo causado por la presencia de peróxido de hidrógeno, metilviológeno y atrazina con respecto a la expresión basal de la proteína (ausencia de diferencias significativas,  $p \leq 0,05$ ; LSD) (datos no mostrados).

En *Pseudomonas fluorescens*, la expresión y acumulación de flavodoxina también proporcionó una mayor tolerancia al estrés oxidativo causado por los agentes oxidantes estudiados.

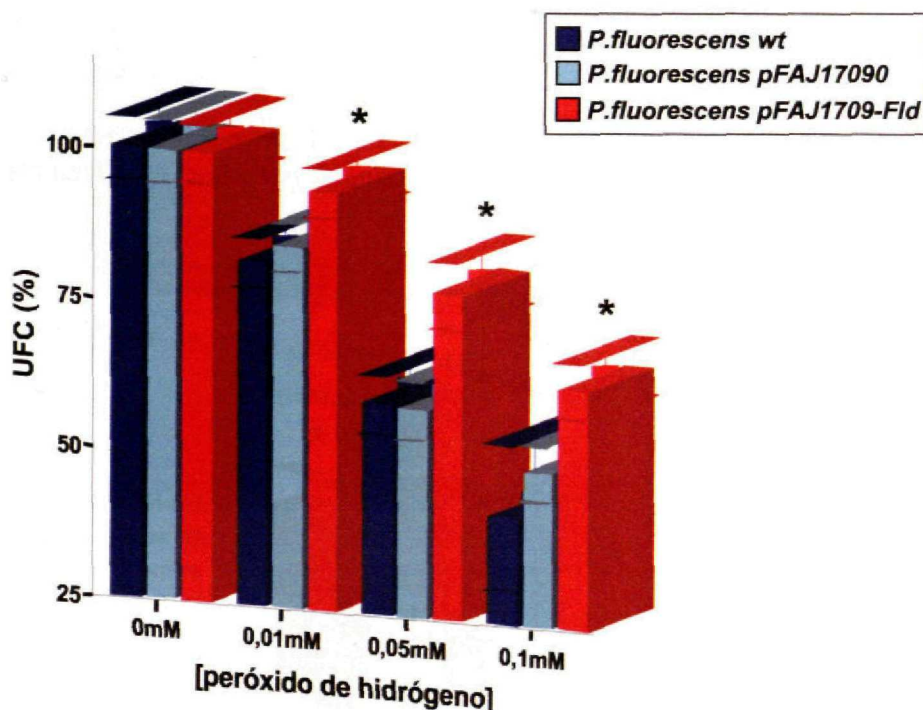


Figura 3.7. *Evaluación de la capacidad protectora de la flavodoxina frente al estrés oxidativo por peróxido de hidrógeno en Pseudomonas fluorescens*. Efecto del peróxido de hidrógeno en placa (0,01mM, 0,05mM y 0,1mM) sobre el crecimiento de *Pseudomonas fluorescens* aur6 (wt, pFAJ1709 y pFAJ1709-Fld). Se representa el % de unidades formadoras de colonias (UFC) a las 36 horas de crecimiento. Los datos proceden de 5 experimentos independientes. (\*) Diferencias significativas entre bacterias ( $p \leq 0,05$ ; LSD).

Cuando se utilizó peróxido de hidrógeno como agente oxidante, las bacterias de *Pseudomonas fluorescens* que expresan flavodoxina (pFAJ1709-Fld) fueron capaces de crecer (96% de UFC) a una concentración de 0,01 mM mientras que el crecimiento de las bacterias control (wt y pFAJ1709) fue del 80% de UFC. Con una concentración de 0,01 mM las diferencias de UFC con respecto a la ausencia de estrés oxidativo, fueron del 65% en las bacterias que expresan flavodoxina y del 45% en las bacterias control (Figura 3.7).



En presencia de metilviológeno, el crecimiento de las bacterias control en las concentraciones 0,01-0,05-0,1 mM fue del 75%, 60% y 27% respectivamente, mientras que las bacterias de *Pseudomonas fluorescens* que acumulan la proteína flavodoxina presentaron un crecimiento del 90%, 72% y 58% de UFC con respecto a las bacterias crecidas en ausencia de metilviológeno (Figura 3.8).

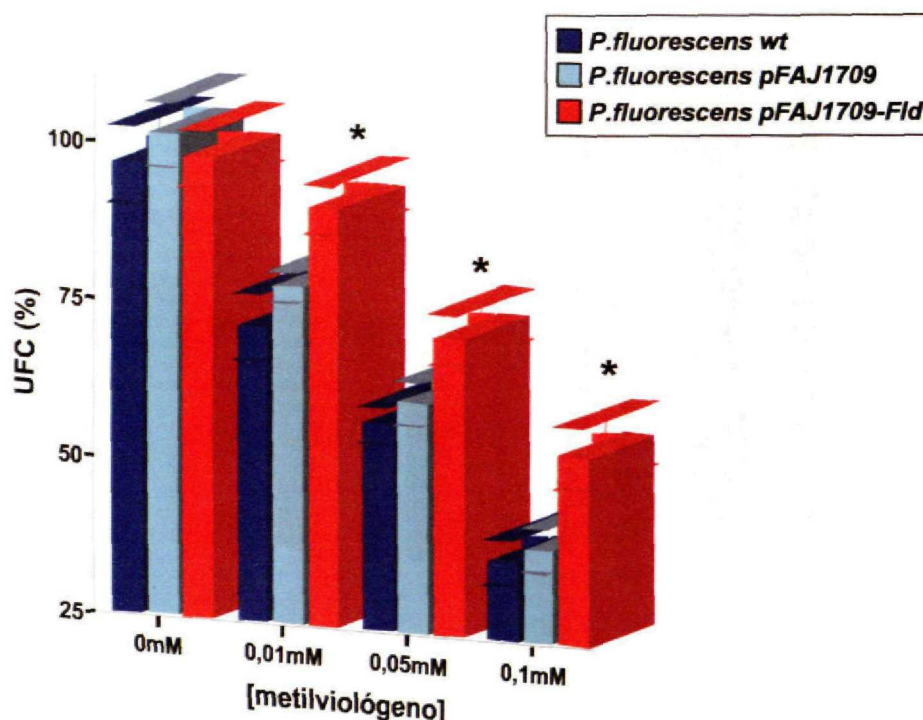


Figura 3.8. *Evaluación de la capacidad protectora de la flavodoxina frente al estrés oxidativo por metilviológeno en Pseudomonas fluorescens*. Efecto del metilviológeno en placa (0,01mM, 0,05mM y 0,1mM) sobre el crecimiento de *Pseudomonas fluorescens* aur6 (wt, pFAJ1709 y pFAJ1709-Fld). Se representa el % de unidades formadoras de colonias (UFC) a las 36 horas de crecimiento. Los datos proceden de 5 experimentos independientes. (\*) Diferencias significativas entre bacterias ( $p \leq 0,05$ ; LSD).

Cuando se utilizaron concentraciones 0,001 y 0,005 mM de atrazina, no hubo diferencias significativas entre las bacterias de *Pseudomonas fluorescens*. El % de UFC fue del 88% y 48% respectivamente. No obstante, en presencia de concentraciones mayores, 0,05 y 0,1 mM, las bacterias que expresan y acumulan flavodoxina presentaron un 37% y 18% de UFC frente al 18% y 8% de las bacterias control (Figura 3.9).

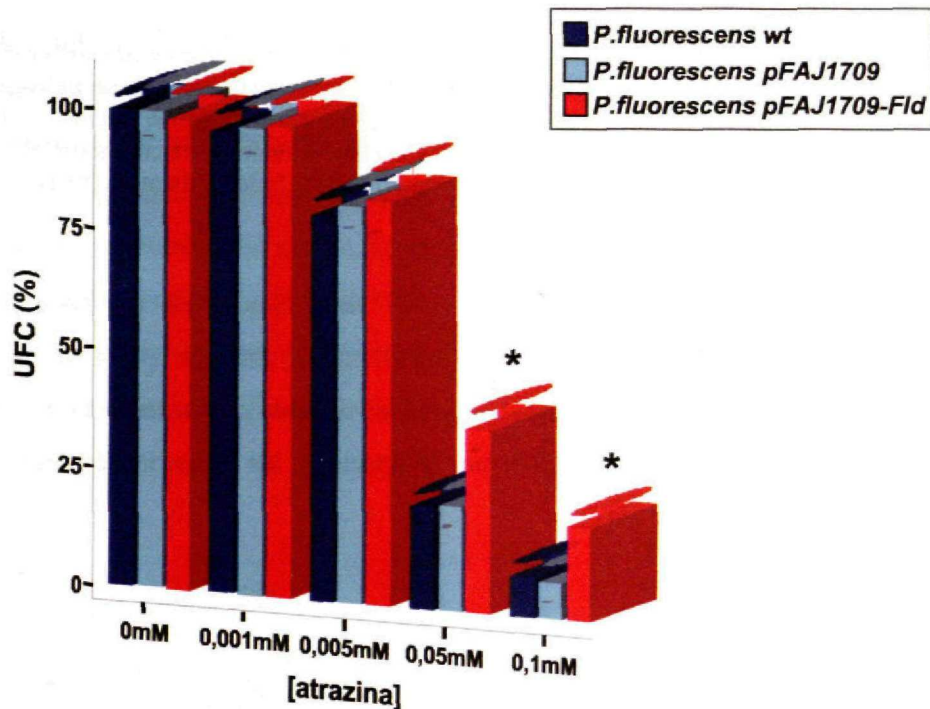


Figura 3.9. Evaluación de la capacidad protectora de la flavodoxina frente al estrés oxidativo por atrazina en *Pseudomonas fluorescens*. Efecto del atrazina en placa (0,001mM, 0,005mM, 0,5mM y 0,1mM) sobre el crecimiento de *Pseudomonas fluorescens* aur6 (wt, pFAJ1709 y pFAJ1709-Fld). Se representa el % de unidades formadoras de colonias (UFC) a las 36 horas de crecimiento. Los datos proceden de 5 experimentos independientes. (\*) Diferencias significativas entre bacterias ( $p \leq 0,05$ ; LSD).

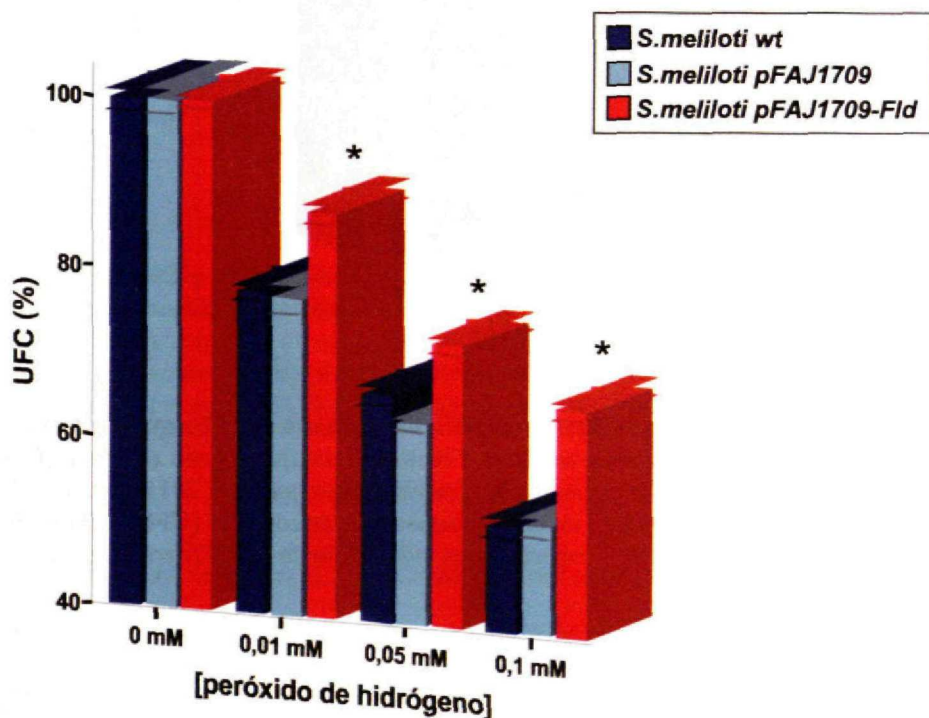




Figura 3.10. *Evaluación de la capacidad protectora de la flavodoxina frente al estrés oxidativo por peróxido de hidrógeno en Sinorhizobium meliloti*. Efecto del peróxido de hidrógeno en placa (0,01mM, 0,05mM y 0,1mM) sobre el crecimiento de *Sinorhizobium meliloti* 2011 (wt, pFAJ1709 y pFAJ1709-Fld). Se representa el % de unidades formadoras de colonias (UFC) a las 48 horas de crecimiento. Los datos proceden de 5 experimentos independientes. (\*) Diferencias significativas entre bacterias ( $p \leq 0,05$ ; LSD).

La protección que supuso la expresión de flavodoxina en bacterias de *Sinorhizobium meliloti* (pFAJ1709-Fld) fue notablemente inferior a la observada en *Escherichia coli* cuando se utilizaron los diferentes agentes oxidantes estudiados. No obstante, la protección fue significativa con respecto a las bacterias control (wt y pFAJ1709).

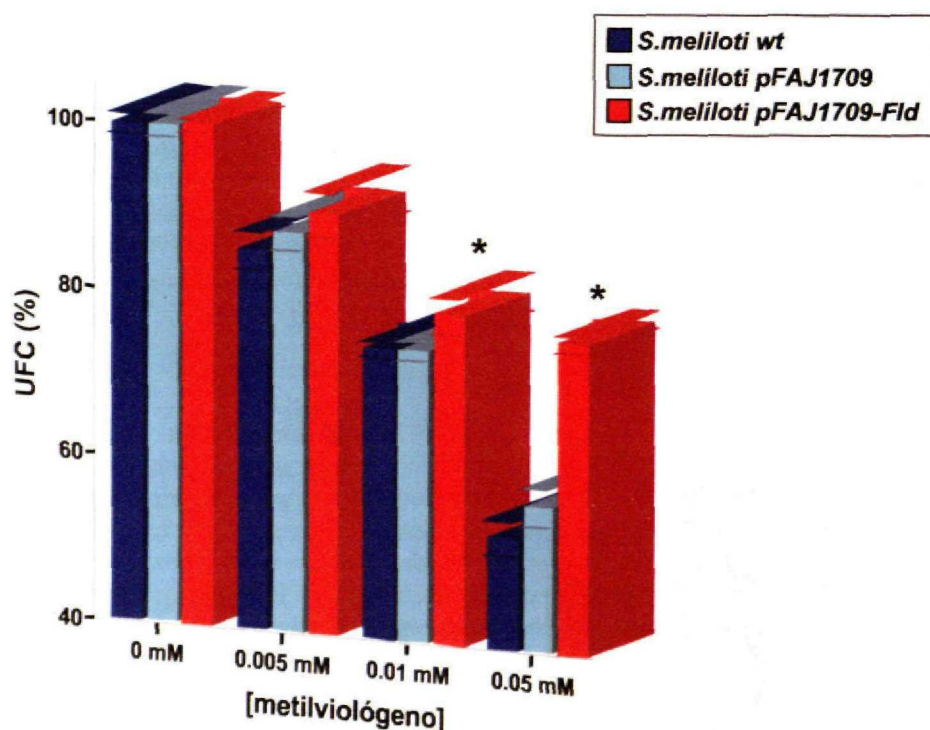


Figura 3.11. *Evaluación de la capacidad protectora de la flavodoxina frente al estrés oxidativo por metilviológeno en Sinorhizobium meliloti*. Efecto del metilviológeno en placa (0,005mM, 0,01mM y 0,05mM) sobre el crecimiento de *Sinorhizobium meliloti* 2011 (wt, pFAJ1709 y pFAJ1709-Fld). Se representa el % de unidades formadoras de colonias (UFC) a las 48 horas de crecimiento. Los datos proceden de 5 experimentos independientes. (\*) Diferencias significativas entre bacterias ( $p \leq 0,05$ ; LSD).

En el caso del peróxido de hidrógeno (Figura 3.10), a una concentración de 0,01 mM las UFC de las bacterias control se situaron en torno al 80% frente al 90% de las

bacterias que expresan la flavodoxina. Cuando se trata de concentraciones mayores, 0,1 mM, las diferencias se situaron en torno al 50% y 70% de UFC respectivamente

Cuando se utilizó metilviológeno como agente oxidante, a una concentración 0,005 mM no hubo diferencias significativas entre las bacterias de *Sinorhizobium meliloti*. No obstante, en presencia de concentraciones superiores las bacterias que expresan la flavodoxina presentaron una mayor tolerancia. A una concentración 0,05 mM, las bacterias control presentaron alrededor del 50% de UFC mientras que las bacterias que expresan la flavodoxina se situaron cerca de 70% de UFC (Figura 3.11).

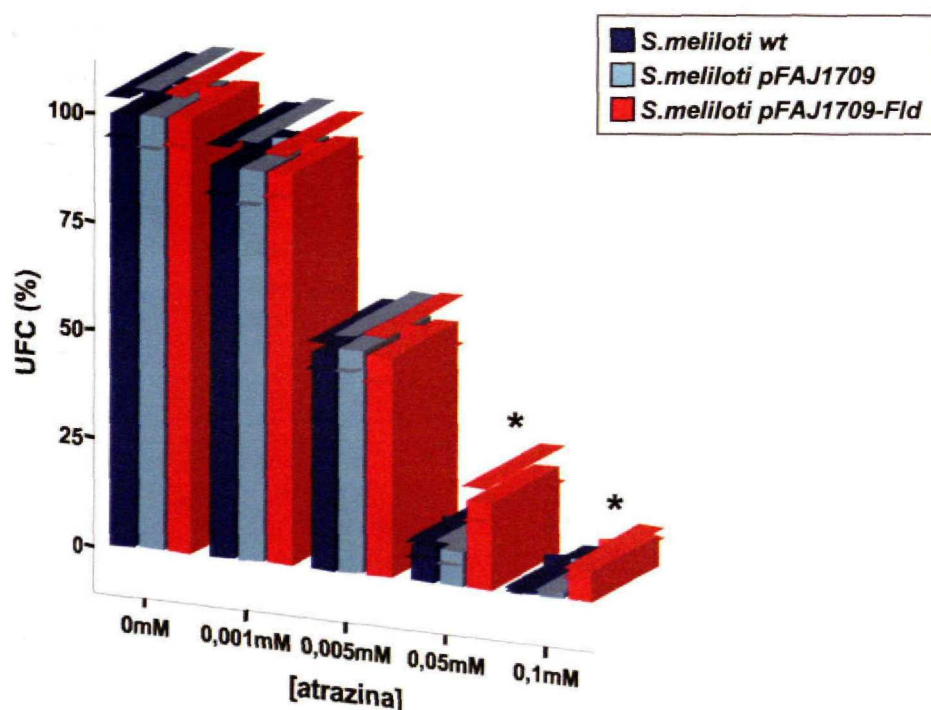


Figura 3.12. *Evaluación de la capacidad protectora de la flavodoxina frente al estrés oxidativo por atrazina en Sinorhizobium meliloti*. Efecto de la atrazina en placa (0,001mM, 0,005mM, 0,05mM y 0,1mM) sobre el crecimiento de *Sinorhizobium meliloti* 2011 (wt, pFAJ1709 y pFAJ1709-Fld). Se representa el % de unidades formadoras de colonias (UFC) a las 48 horas de crecimiento. Los datos proceden de 5 experimentos independientes. (\*) Diferencias significativas entre bacterias ( $p \leq 0,05$ ; LSD).

En presencia de atrazina, cuando se utilizan concentraciones 0,001 y 0,005 mM, no hubo diferencias significativas entre las bacterias de *Sinorhizobium meliloti*. El % de UFC se situó en 88% y 48% respectivamente. No obstante en presencia de concentraciones mayores, 0,05 y 0,1 mM, las bacterias que expresan y acumulan la



proteína flavodoxina presentaron un 21% y 8% de UFC frente al 9% y 2% de las bacterias control (Figura 3.12).

### 3. Efecto de la expresión de flavodoxina en bacteroides sobre el proceso de senescencia natural de los nódulos de *Medicago sativa*

Se estudió el efecto de la expresión y acumulación de la proteína flavodoxina en los bacteroides de *Sinorhizobium meliloti* de nódulos de *Medicago sativa*, sobre la nodulación, la capacidad fijadora de nitrógeno, el metabolismo oxidativo y carbonado y la estructura y ultraestructura del nódulo.

#### 3.1. Nodulación

Se estudió el efecto de la flavodoxina sobre la capacidad simbiótica de las bacterias mediante ensayos de nodulación de *Sinorhizobium meliloti* 2011 (wt, pFAJ1709 y pFAJ1709-Fld) en plantas de *Medicago sativa*.

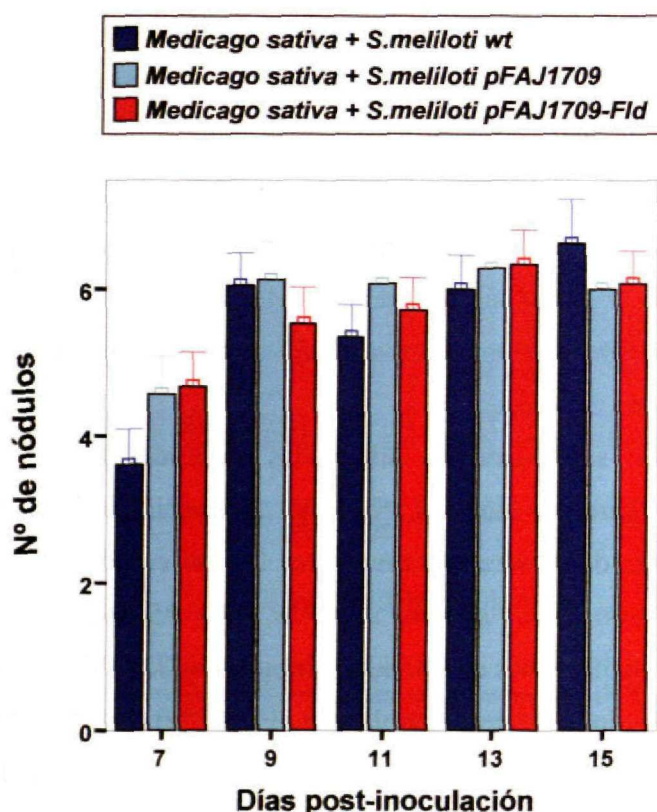


Figura 3.13. **Nodulación.** Ensayos de nodulación de *Sinorhizobium meliloti* 2011 (wt, pFAJ1709 y pFAJ1709-Fld) en plantas de *Medicago sativa* cv. Aragon-R1. Los valores representan la media y las barras de error la desviación típica de la media. Los datos proceden de 2 experimentos independientes. (\*) Diferencias significativas entre inóculos ( $p \leq 0.05$ ; LSD).



No se observaron diferencias significativas en el número de nódulos entre los diferentes inóculos para ninguno de los tiempos post-inoculación estudiados (Figura 3.13). Entre los 7 y 9 dpi se observó un incremento significativo en el número de nódulos. A los 9 dpi, prácticamente todos los nódulos se encontraban formados o en desarrollo.

### 3.2. Fijación de nitrógeno

Se evaluó la capacidad fijadora de nitrógeno de plantas de *Medicago sativa* inoculadas con *Sinorhizobium meliloti* 2011 (wt, pFAJ1709 y pFAJ1709-Fld) mediante ensayos de reducción de acetileno (ARA) a diferentes tiempos post-inoculación (10-44 dpi). Se estimó la actividad nitrogenasa específica como  $\mu\text{moles}$  de acetileno reducidos por hora por gramo de nódulo fresco ( $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) (Figura 3.14).

Hasta los 18 dpi, donde se detectó el máximo de actividad nitrogenasa por gramo de nódulo fresco ( $36 \text{ mM C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ), hubo un importante incremento en la reducción del acetileno. A los 10 y 14 dpi, no hubo diferencias significativas entre los nódulos procedentes de los diferentes inóculos (wt, pFAJ1709 y pFAJ1709-Fld). No obstante a los 10 dpi, aparentemente se observó una mayor reducción de acetileno en los nódulos cuyos bacteroides expresan flavodoxina, aunque no de manera significativa.

Entre los 18 y 25 dpi no hubo diferencias significativas entre inóculos. Tampoco hubo diferencias significativas entre estos tiempos, si bien comenzó a apreciarse el descenso de la actividad nitrogenasa.

A los 28 dpi se observaron diferencias significativas entre los nódulos procedentes de los diferentes inóculos. No hubo diferencias significativas entre los nódulos de las plantas de *Medicago sativa* a los 28 dpi con *Sinorhizobium meliloti* pFAJ1709-Fld y el resto de los nódulos a los 18, 22 y 25 dpi. A los 28 dpi, estos nódulos presentaron un 39 % más de actividad nitrogenasa ( $32 \text{ mM C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) que los nódulos procedentes de los inóculos control (wt y pFAJ1709) ( $22\text{-}24 \text{ mM C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ).

A los 32 dpi, en los nódulos de las plantas de *Medicago sativa* inoculadas con *Sinorhizobium meliloti* pFAJ1709-Fld se detectó aproximadamente un 50 % más de actividad nitrogenasa ( $26 \text{ mM C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) que los nódulos procedentes de los inóculos control (wt y pFAJ1709) ( $18\text{-}17 \text{ mM C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ).

A los 36 dpi la actividad nitrogenasa de los nódulos de las plantas de *Medicago sativa* inoculadas con *Sinorhizobium meliloti* pFAJ1709-Fld fue un 81% más alta que la

actividad de los nódulos procedentes de los inóculos control (wt y pFAJ1709) (11 mM  $C_2H_4$  g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>).

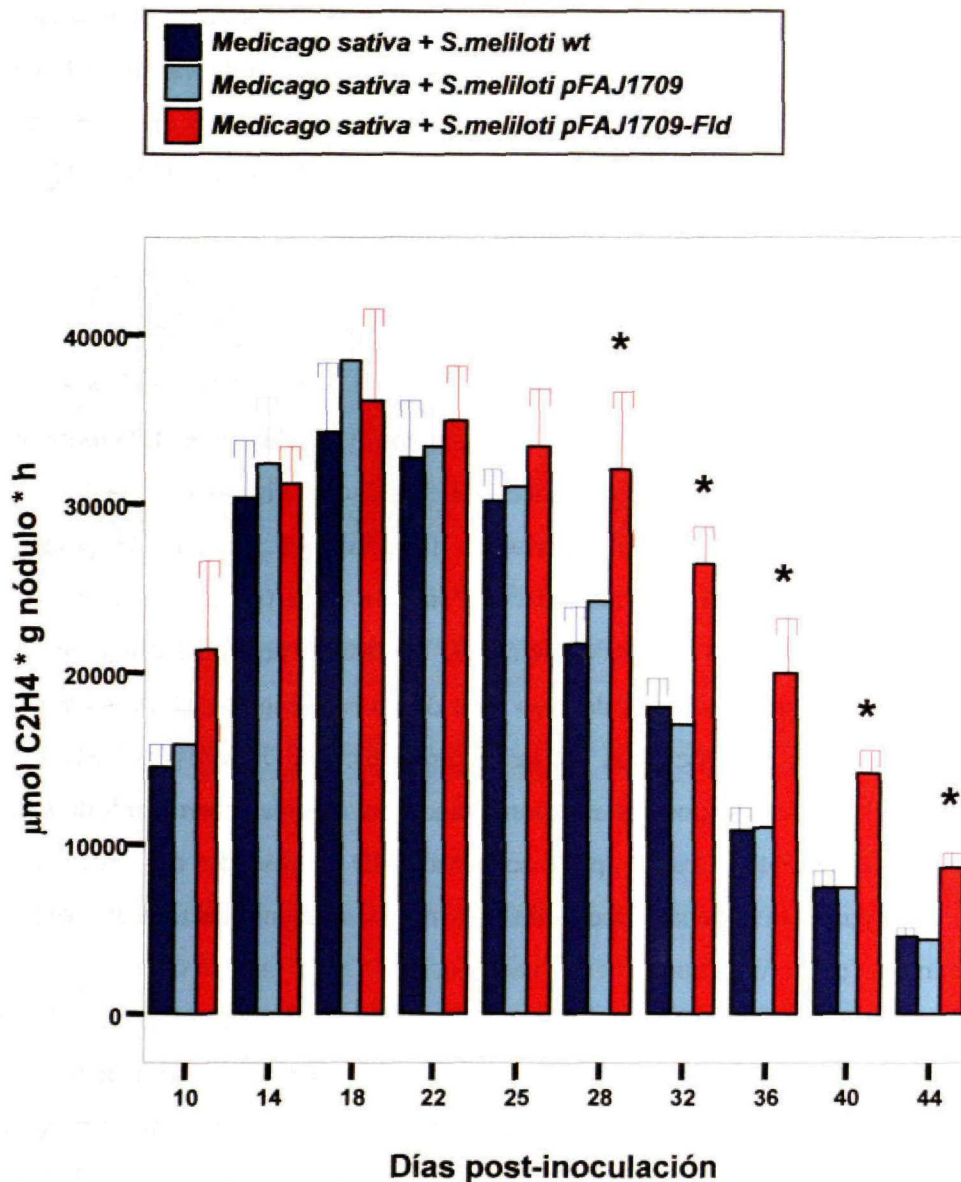


Figura 3.14. **Actividad fijadora de nitrógeno.** Ensayos de reducción de acetileno ( $\mu\text{mol } C_2H_4 \text{ gr}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) en nódulos de plantas de *Medicago sativa* cv. Aragon-R1 a diferentes días post-inoculación con *Sinorhizobium meliloti* 2011 (wt, pFAJ1709 y pFAJ1709-Fld). Los valores representan la media y las barras de error la desviación típica de la media. Los datos proceden de 3 experimentos independientes. (\*) Diferencias significativas entre inóculos ( $p \leq 0.05$ ; LSD).

A los 40 y 44 dpi, los nódulos de las plantas de *Medicago sativa* inoculadas con *Sinorhizobium meliloti* pFAJ1709-Fld reducían prácticamente el doble de acetileno (14



y 8,5 mM  $C_2H_4$  g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> respectivamente) que los nódulos procedentes de los inóculos control (wt y pFAJ1709) (7,4 y 4,4 mM  $C_2H_4$  g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> respectivamente).

Se estudiaron posibles variaciones en el peso de la parte aérea de la planta y de los nódulos derivadas del efecto de flavodoxina sobre el mantenimiento de la capacidad fijadora de nitrógeno anteriormente evaluada. No se observaron diferencias significativas en el peso fresco y seco de la parte aérea de la planta y en el peso fresco de los nódulos, entre los diferentes inóculos (wt, pFAJ1709 y pFAJ1709-Fld) a los diferentes tiempos post-inoculación (datos no mostrados).

### 3.3. Metabolismo oxidativo

Se analizaron la actividad superóxido dismutasa y catalasa y se determinaron las principales actividades, metabolitos e índices del ciclo ascorbato-glutation.

Se determinó la actividad superóxido dismutasa en nódulos de plantas de *Medicago sativa* inoculadas con *Sinorhizobium meliloti* 2011 (pFAJ1709 y pFAJ1709-Fld) a los 18, 32 y 44 días post-inoculación. Se expresó la actividad específica como unidades por mg de proteína o mg de peso seco de nódulo (Figura 3.15A y Tabla 3.1). No hubo diferencias significativas en las estimaciones de la actividad SOD entre inóculos para cada tiempo post-inoculación cuando las medidas fueron referidas a mg de proteína. No obstante, a los 32 dpi, la actividad SOD en unidades mg<sup>-1</sup> peso seco de nódulo fue significativamente menor en los nódulos cuyos bacteroides expresan flavodoxina. Se observó un aumento de la actividad SOD con la edad del nódulo. En los nódulos control se observó un aumento del 10% entre los 18 y 32 dpi y del 25% entre los 32 y 44 dpi (50% y 63% respectivamente en la estimación de unidades de SOD mg<sup>-1</sup> peso seco). En los nódulos de las plantas inoculadas con *Sinorhizobium meliloti* pFAJ1709-Fld el aumento de la actividad SOD fue menos pronunciado a los 32 dpi. Se observó un aumento entre los 18 y 32 dpi del 3% ( $p \leq 0,05$ ) y del 30% entre los 32 y 44 dpi (23% y 79% respectivamente en la estimación de unidades de SOD mg<sup>-1</sup> peso seco).

Se determinó la actividad catalasa en nódulos de plantas de *Medicago sativa* inoculadas con *Sinorhizobium meliloti* 2011 (pFAJ1709 y pFAJ1709-Fld) a los 18, 32 y 44 días post-inoculación. Se expresó la actividad específica como  $\mu$ moles de  $H_2O_2$  oxidados por minuto y mg de proteína o g de peso seco de nódulo (Figura 3.15B y Tabla 3.1). A los 18 y 32 dpi no hubo diferencias significativas en las estimaciones de la actividad catalasa. A los 44 dpi, se observó un descenso de la actividad catalasa tanto en

los nódulos que incluyen los bacteroides que expresan flavodoxina como en los nódulos control. No obstante la actividad catalasa fue significativamente mayor en los nódulos control.

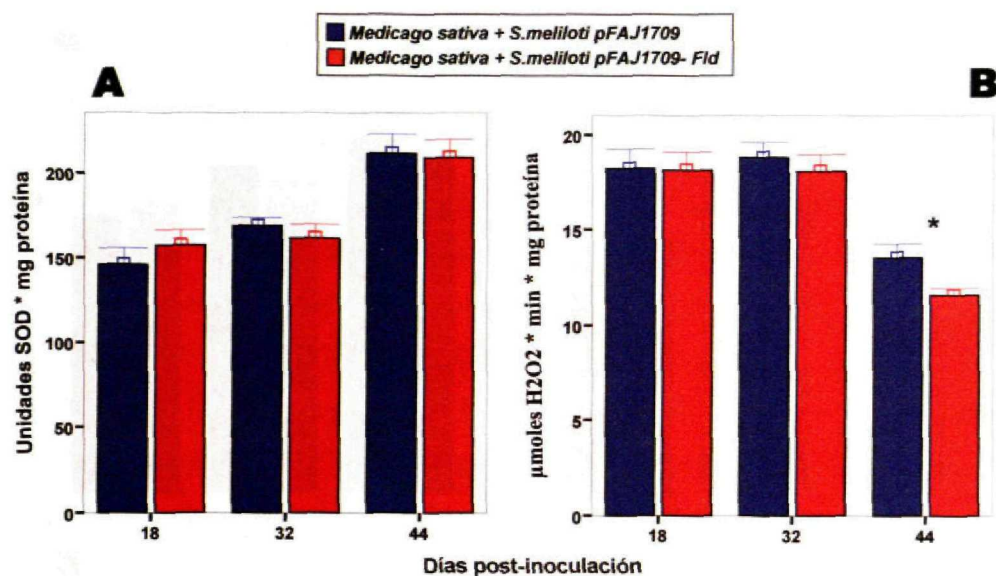


Figura 3.15. **Actividades superóxido dismutasa y catalasa.** Determinación de la actividad SOD (A) y CAT (B) en nódulos de plantas de *Medicago sativa* cv. Aragon-R1 a diferentes días post-inoculación con *Sinorhizobium meliloti* 2011 (pFAJ1709 y pFAJ1709-Fld). La actividad específica se relativizó a mg de proteína. Los valores representan la media de 5 determinaciones y las barras de error la desviación típica de la media. (\*) Diferencias significativas entre inóculos ( $p \leq 0.05$ ; LSD).

Se determinaron las principales actividades del ciclo ascorbato-glutation: ascorbato peroxidasa, monodehidroascorbato reductasa, dehidroascorbato reductasa y glutathione reductasa (Figura 3.16 y Tabla 3.1), se midió el contenido de glutathione oxidado y reducido y se calcularon los balances redox para el glutathione (Figura 3.17 y Tabla 3.1) en los nódulos de plantas de *Medicago sativa* inoculadas con *Sinorhizobium meliloti* 2011 (pFAJ1709 y pFAJ1709-Fld) a los 18, 32 y 44 días post-inoculación.

Se determinó la actividad APX y se expresó la actividad específica como nmoles de ácido ascórbico oxidados por minuto y mg de proteína o μmoles de ácido ascórbico oxidados por minuto y g de peso seco de nódulo (Figura 3.16A y Tabla 3.1). A los 18 y 32 dpi, la actividad APX fue significativamente mayor en los nódulos de las plantas inoculadas con *Sinorhizobium meliloti* pFAJ1709-Fld. No obstante, a los 18 dpi, no hubo diferencias significativas en la estimación de la actividad APX como  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$  peso nódulo. A los 44 dpi, la actividad APX fue sensiblemente mayor en los nódulos control e incluso de manera significativa en la estimación de la actividad APX como



$\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$  peso nódulo. Se observó un descenso generalizado en la actividad APX entre los 18 y 44 dpi de forma similar en ambos tipos de nódulos.

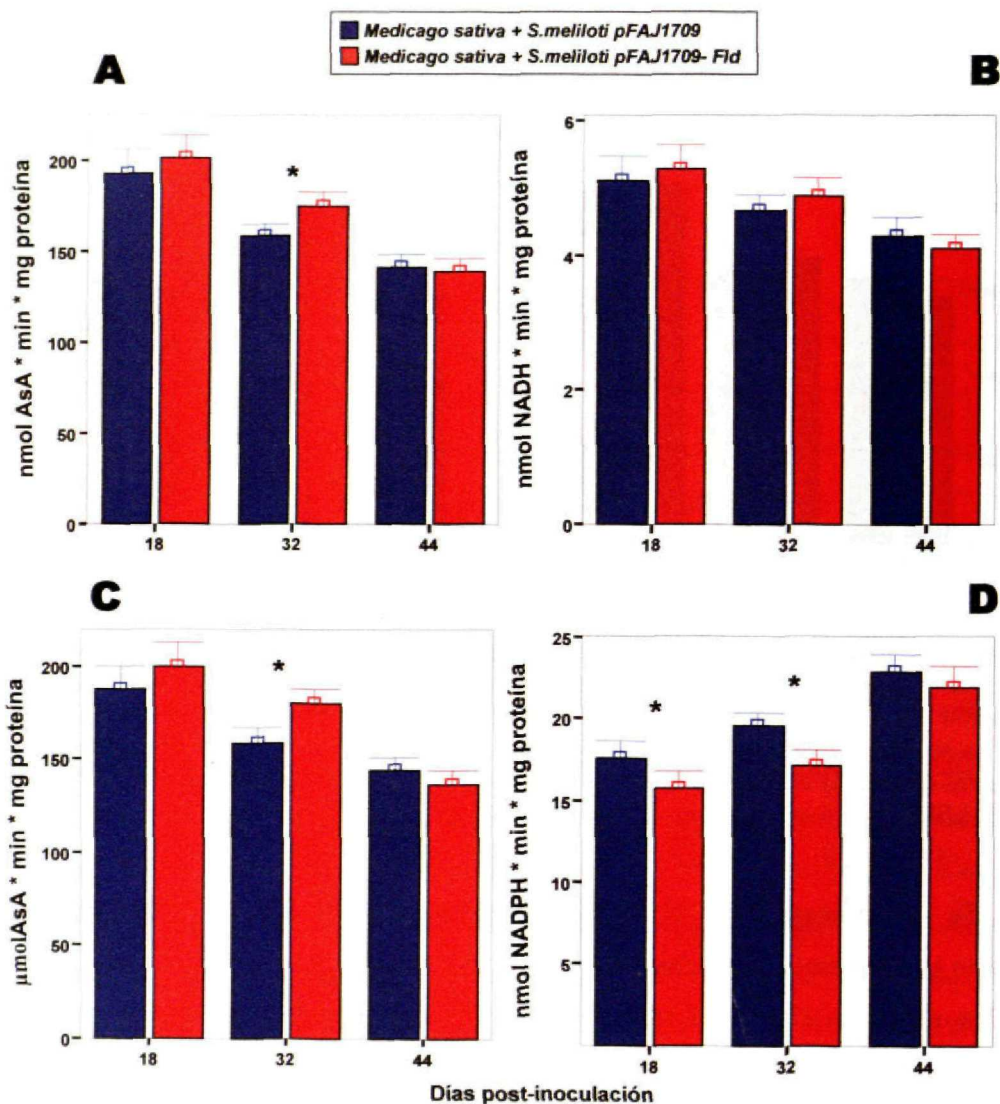


Figura 3.16. *Actividades enzimáticas del ciclo ascorbato-glutation*. Determinaciones enzimáticas en nódulos de plantas de *Medicago sativa* cv. Aragon-R1 a diferentes días post-inoculación con *Sinorhizobium meliloti* 2011 (pFAJ1709 y pFAJ1709-Fld). (A) APX, ascorbato peroxidasa; (B) MDHAR, monodehidroascorbato reductasa; (C) DHAR, dehidroascorbato reductasa; (D) GR, glutatión reductasa. Las actividades específicas se relativizaron a mg de proteína. Los valores representan la media de 7 determinaciones y las barras de error la desviación típica de la media. (\*) Diferencias significativas entre inóculos ( $p \leq 0.05$ ; LSD).

Se determinó la actividad MDHAR y se expresó la actividad específica como nmoles de NADH oxidados por minuto y mg de proteína o  $\mu\text{moles}$  de NADH oxidados por minuto y g de peso seco de nódulo (Figura 3.16B y Tabla 3.1). En general, no hubo diferencias significativas en las estimaciones de la actividad MDHAR entre inóculos

para cada dpi. Se observó un descenso con el tiempo en la actividad MDHAR similar en ambos tipos de nódulos.

Se determinó la actividad DHAR y se expresó la actividad específica como nmoles de ácido ascórbico oxidados por minuto y mg de proteína o  $\mu$ moles de ácido ascórbico oxidados por minuto y g de peso seco de nódulo (Figura 3.16C y Tabla 3.1). Aunque a los 18 y 32 dpi, la actividad DHAR fue mayor en los nódulos de las plantas inoculadas con *Sinorhizobium meliloti* pFAJ1709-Fld, las diferencias únicamente fueron significativas a los 32 dpi. A los 44 dpi, la actividad DHAR fue sensiblemente mayor en los nódulos control e incluso de manera significativa en la estimación de la actividad DHAR como  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$  peso nódulo. Se observó un descenso generalizado en la actividad DHAR entre los 18 y 44 dpi en ambos tipos de nódulos. A los 32 dpi, en los nódulos control hubo un descenso de la actividad DHAR significativo mientras que en los nódulos que acumulan flavodoxina, el descenso en la actividad no fue significativo. Sin embargo, entre los 32 y 44 dpi, la caída en la actividad DHAR fue más pronunciada en los nódulos que acumulan flavodoxina.

Se determinó la actividad GR y se expresó la actividad específica como nmoles de NADPH oxidados por minuto y mg de proteína o  $\mu$ moles de NADPH oxidados por minuto y g de peso seco de nódulo (Figura 3.16D y Tabla 3.1). La actividad GR fue mayor en los nódulos control, no obstante las diferencias fueron únicamente significativas para la determinación de la actividad GR como  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  proteína a los 18 y 32 dpi. En general, se observó un incremento de la actividad GR entre los 18 y 44 dpi similar en ambos tipos de nódulos.

El contenido de glutatión reducido (GSH) y oxidado (GSSG) determinado se expresó como nmoles por mg de proteína o g de peso seco de nódulo y se calculó el balance redox del glutatión (GSH/GSSG) de ambas estimaciones (Figura 3.17 y Tabla 3.1).

El contenido de GSH y de GSSG fue generalmente superior en los nódulos control. Se observaron diferencias significativas en las cantidades de GSH y GSSG a los 32 dpi, y a los 18 dpi para el GSSG expresado como nmoles  $\text{mg}^{-1}$  proteína. En general, se observó un aumento en la cantidad de GSH (Figura 3.17A) y GSSG (Figura 3.17B) en ambos tipos de nódulos, entre los 18 y 44 dpi. En los nódulos control, el incremento de GSH fue lineal ( $R^2=0,99$ ), mientras que en los nódulos cuyos bacteroides expresan flavodoxina, entre los 18 y 32 dpi, el incremento no fue significativo. El incremento de GSSG mostró dos tramos con pendientes bien diferenciadas entre los 18 y 32 dpi y los



32 y 44 dpi en ambos tipos de nódulos. No obstante, el incremento en los nódulos de las plantas inoculadas con *Sinorhizobium meliloti* pFAJ1709-Fld, de nuevo presentó pendientes mas suaves entre los 18 y 32 dpi con respecto a los nódulos control.

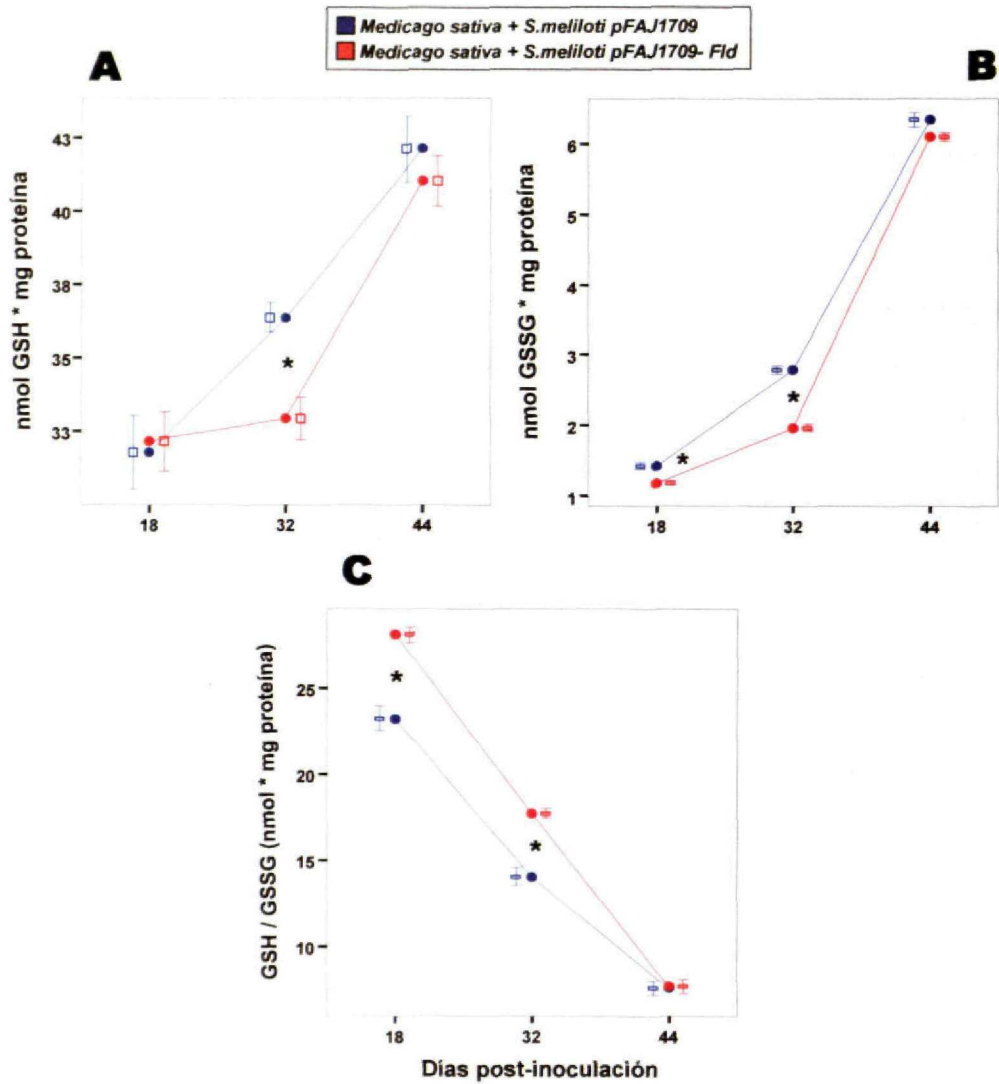


Figura 3.17. **Glutation.** Determinación del glutation reducido y oxidado y cálculo del balance de glutation (GSH/GSSG) en nódulos de plantas de *Medicago sativa* cv. Aragon-R1 a diferentes días post-inoculación con *Sinorhizobium meliloti* 2011 (pFAJ1709 y pFAJ1709-Fld). (A) GSH, glutation reducido; (B) GSSG, glutation oxidado; (C) GSH/GSSG, balance redox del glutation. La cantidad de glutation se relativizó a mg de proteína. Los valores representan la media de 6 determinaciones y las barras de error la desviación típica de la media. (\*) Diferencias significativas entre inóculos ( $p \leq 0.05$ ; LSD).

A los 18 y 32 dpi, se observó un balance redox de glutation más positivo en los nódulos de las plantas inoculadas con *Sinorhizobium meliloti* pFAJ1709-Fld (Figura 3.17C). Se observaron diferencias significativas a los 18 dpi, en la estimación del

balance procedente de las determinaciones relativizadas a la cantidad de proteínas, y a los 32 dpi en ambas estimaciones. A los 44 dpi, los balances fueron similares en ambos tipos de nódulos.

### 3.4. Metabolismo carbonado

Se estudiaron las actividades enzimáticas sacarosa sintasa y fosfoenolpiruvato carboxilasa representativas del metabolismo carbonado del nódulo, en nódulos de plantas de *Medicago sativa* inoculadas con *Sinorhizobium meliloti* 2011 (wt, pFAJ1709 y pFAJ1709-Fld) a los 18, 32 y 44 días post-inoculación. Se expresó la actividad específica como nmoles de NADPH o NADH oxidado por minuto y mg de proteína respectivamente (Figura 3.18 y Tabla 3.1).

Aunque en general, las actividades SS y PEPc fueron ligeramente inferiores en los nódulos control, no hubo diferencias significativas. En ambas actividades, se observó un incremento a lo largo del tiempo. Entre los 32 y 44 dpi, hubo un incremento significativo de las actividades SS y PEPc de manera similar para ambos tipos de nódulos.

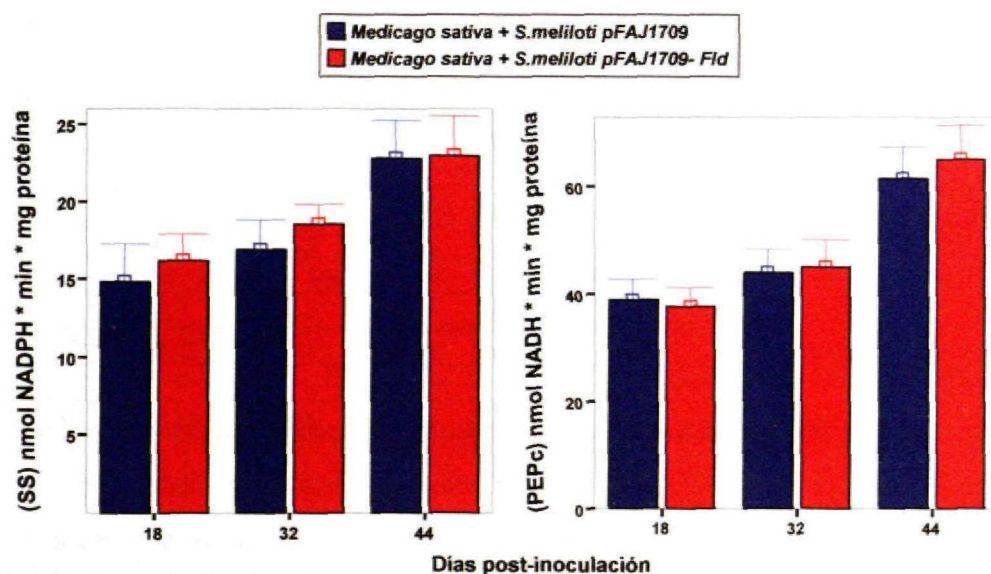


Figura 3.18. *Actividades sacarosa sintasa (SS) y fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPc).* Determinación de las actividades SS y PEPc en nódulos de plantas de *Medicago sativa* cv. Aragon-R1 a diferentes días post-inoculación con *Sinorhizobium meliloti* 2011 (pFAJ1709 y pFAJ1709-Fld). La actividad específica se expresó como  $\mu$ moles de NADPH ó NADH oxidado por minuto y relativizado a mg de proteína. Los valores representan la media de 8 determinaciones y las barras de error la desviación típica de la media. (\*) Diferencias significativas entre inóculos ( $p \leq 0.05$ ; LSD).



■ *Medicago sativa* + *S.meliloti* pFAJ1709  
 ■ *Medicago sativa* + *S.meliloti* pFAJ1709-Fld

	18 DPI	18 DPI	32 DPI	32 DPI	44 DPI	44 DPI
<b>SOD</b>						
Unids SOD mg <sup>-1</sup> proteína	145,89a	156,92ab	168,34b	161,23ab	211,34c	208,71c
Unids SOD g <sup>-1</sup> nódulo sec	7,24a	7,45a	10,83c	9,17b	17,67d	16,45d
<b>CAT</b>						
μmol min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> proteína	18,18a	18,12a	18,8a	18,05a	13,546b	11,578c
μmol min <sup>-1</sup> g <sup>-1</sup> nódulo sec	534,87a	512,93a	545,9a	521,78a	398,24b	361,21b
<b>APX</b>						
nmol min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> proteína	193,22ab	201,21a	158,26cd	175,21bc	141,34de	138,84e
μmol min <sup>-1</sup> g <sup>-1</sup> nódulo sec	98,25b	109,11a	81,33cd	90,86bc	75,34de	68,75e
<b>MDHAR</b>						
nmol min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> proteína	5,12ab	5,30a	4,67bc	4,89ab	4,29c	4,11c
μmol min <sup>-1</sup> g <sup>-1</sup> nódulo sec	49,95ab	50,67a	44,62bc	47,76ab	39,87cd	38,09d
<b>DHAR</b>						
μmol min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> proteína	187,65ab	199,65a	158,65c	179,65b	143,85cd	136,65d
μmol min <sup>-1</sup> g <sup>-1</sup> nódulo sec	8,23a	8,67a	6,15c	7,23b	6,03c	5,54c
<b>GR</b>						
nmol min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> proteína	17,60ab	15,79a	19,57b	17,18a	22,93c	21,96c
μmol min <sup>-1</sup> g <sup>-1</sup> nódulo sec	56,41ab	52,76a	69,29b	57,93ab	72,13c	71,83c
<b>GSH</b>						
nmol mg <sup>-1</sup> proteína	31,79a	32,19a	36,37b	32,95ab	42,09c	40,99c
nmol g <sup>-1</sup> nódulo sec	149,96a	149,68a	180,49b	156,32a	208,61c	210,65c
<b>GSSG</b>						
nmol mg <sup>-1</sup> proteína	1,43a	1,19a	2,79c	1,97b	6,34d	6,10d
nmol g <sup>-1</sup> nódulo sec	6,21ab	5,92a	10,01c	7,03b	20,68c	19,71c
<b>GSH/GSSG</b>						
(mg <sup>-1</sup> proteína)	23,21a	28,04a	14,05c	17,73b	7,64d	7,72d
(g <sup>-1</sup> nódulo sec)	25,13a	26,27a	19,02c	23,24b	11,09d	11,69d
<b>SS</b>						
nmol mg <sup>-1</sup> proteína	14,84a	16,21ab	16,90ab	18,60b	22,83c	22,95c
<b>PEPc</b>						
nmol mg <sup>-1</sup> proteína	39,08a	37,85a	44,09a	45,02a	61,53b	65,20b

Tabla 3.1. **Metabolismo oxidativo y carbonado.** Determinaciones de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos del metabolismo oxidativo y actividades enzimáticas del metabolismo carbonado en nódulo de plantas de *Medicago sativa* cv. Aragon-R1 a diferentes días post-inoculación con *Sinorhizobium meliloti* 2011 (pFAJ1709 y pFAJ1709-Fld). SOD, superóxido dismutasa; CAT, catalasa; APX, ascorbato peroxidasa; MDHAR, monodehidroascorbato peroxidasa; DHAR, dehidroascorbato peroxidasa; GR, glutatión reductasa; GSH, glutatión reducido; GSSG, glutatión oxidado; GSH/GSSG, balance redox del glutatión. Los valores representan la media de 5-8 determinaciones. Las diferencias significativas están representadas con diferentes letras ( $p \leq 0.05$ ; LSD).

### 3.5. Características estructurales y ultraestructurales.

Se estudiaron las características estructurales y ultraestructurales de los nódulos de plantas de *Medicago sativa* inoculadas con *Sinorhizobium meliloti* 2011 control (wt ó pFAJ1709) y pFAJ1709-Fld mediante microscopía óptica y microscopía electrónica de transmisión. Se analizaron nódulos de 10, 30 y 44 dpi. En las descripciones del estudio se empleó la terminología de simbiosomas y tipos de bacteroides (I-V) descrita por Vasse *et al.* (1999).

La sección longitudinal de los nódulos formados por las cepas control (wt ó pFAJ1709) presenta la típica zonación relacionada con el desarrollo de los nódulos indeterminados (Figura 3.19A). En la zona apical se localiza el meristemo persistente responsable del crecimiento elongado del nódulo ( $Z_I$ ) (Figura 3.19B). A continuación y como consecuencia de la elongación, se disponen zonas con diferentes estados de desarrollo y diferenciación en las que se encuentran células infectadas y no infectadas.

En la zona de preinfección o invasión ( $Z_{II}$  distal) se localizan abundantes canales de infección repletos de bacterias (Figuras 3.19B, C y 3.20A, B). La liberación de las bacterias tiene lugar por endocitosis desde las ramificaciones intracelulares de los canales de infección hasta el citoplasma de algunas células huésped (Figura 3.20B). Después de la liberación, la bacteria recibe el nombre de bacteroide, la membrana celular de la vesícula endocítica se conoce como membrana peribacteroidal y entre ambos se localiza el espacio peribacteroidal (Figura 3.20C).

A lo largo de la  $Z_{II}$ , los bacteroides sufren una diferenciación. En la  $Z_{II}$  distal, los bacteroides recién liberados (Tipo I) continúan dividiéndose y tienen una forma irregular debido a las fusiones de la membrana peribacteroidal con vesículas citoplásmicas (Figura 3.20C). Se pueden distinguir las membranas externa e interna del bacteroide (Figura 3.20C). En la  $Z_{II}$  proximal, los bacteroides (Tipo II) son más alargados, están rodeados por una membrana peribacteroidal más regular y el espacio peribacteroidal está muy reducido (Figura 3.20D).

La interzona ( $Z_{II-III}$ ) comprende unas pocas filas de células con gran cantidad de amiloplastos (Figuras 3.19D y 3.20E). Su límite distal está bien definido por la acumulación de almidón mientras que en la parte proximal los límites de la  $Z_{II-III}$  no están claramente definidos (Figura 3.19D). En los bacteroides típicos de la  $Z_{II-III}$  (Tipo III) la elongación ha cesado y ocupan prácticamente la totalidad del citoplasma de la célula infectada, por lo que los orgánulos han sido desplazados a posiciones periféricas



(Figura 3.20E). La diferenciación o maduración de los bacteroides, iniciada ya en la  $Z_{II}$ , se completa con el incremento de la heterogeneidad del contenido citoplásmico de los bacteroides (Figuras 3.20E, F). La heterogeneidad es consecuencia de la disposición de los ribosomas y polisomas (material denso a los electrones) frente al material nuclear (traslucido).

Los simbiosomas formados por bacteroides maduros (Tipo IV) constituyen la unidad funcional en la fijación del nitrógeno. La zona de fijación ( $Z_{III}$ ) contiene grandes células infectadas y repletas de simbiosomas junto con células intersticiales no infectadas (Figuras 3.19E, F). En nódulos de 30 dpi, la  $Z_{III}$  se extiende prácticamente hasta la zona basal (Figura 3.19G). No obstante en las células más proximales comienzan a observarse alteraciones ultraestructurales típicas de la senescencia. Los bacteroides de estas células comienzan a perder su heterogeneidad citosólica debido a la dispersión y cese de la maquinaria fisiológica (Figura 3.20G). En la zona basal o de unión a la raíz, se encuentra el vaso central que distribuye los haces vasculares del nódulo que representan la ruta de importación de fotosintatos y exportación de compuestos nitrogenados. (Figura 3.19G, H).

En la  $Z_{III}$  proximal de los nódulos control de avanzada edad, comienza a desarrollarse una zona de senescencia ( $Z_{IV}$ ) en la que los simbiosomas degeneran y decae la fijación de nitrógeno. La  $Z_{IV}$  es evidente en nódulos de 44 dpi (Figuras 3.19I y 3.20H). Los bacteroides de la  $Z_{IV}$  (Tipo V) han perdido completamente la heterogeneidad del citosol. En la  $Z_{IV}$  más proximal se observan fusiones de los simbiosomas de manera que varios bacteroides quedan rodeados por una membrana peribacteroidal común y finalmente aparecen colapsados y sin apenas contenido citosólico (Figura 3.20H). En estas células, las vacuolas presentan formas irregulares, a menudo dispersas entre los simbiosomas en degeneración y próximas a las membranas peribacteroidales (Figura 3.20H). Los orgánulos dejan de ocupar posiciones periféricas e incluso, en células con avanzado estado de senescencia degeneran, a menudo resultando difíciles de identificar. Las mitocondrias adquieren formas alargadas y se observa una mayor presencia de peroxisomas (datos no mostrados).

En los nódulos senescentes (44 dpi) se observa una zona basal ocupada por células completamente senescentes y canales de infección remanentes (Figura 3.19I), descrita como  $Z_V$  por Timmers *et al.* (2000) y que constituye el reservorio de rizobios en los nódulos senescentes.

En los nódulos de las plantas de *Medicago sativa* inoculadas con *Sinorhizobium meliloti* 2011 pFAJ1709-Fld se observaron algunas alteraciones estructurales y ultraestructurales con respecto a las características típicas de los nódulos control.

En los nódulos de 10 dpi, aparentemente no se apreciaron diferencias significativas a nivel estructural o ultraestructural respecto a las características descritas para los nódulos control (datos no mostrados).

En nódulos de más edad (30 y 44 dpi) aparentemente las  $Z_I$  y  $Z_{II}$  presentaban las características típicas y normales de los nódulos control (datos no mostrados). Las diferencias más notables se encontraron en las zonas más maduras de estos nódulos. Concretamente, se observó una gran acumulación de almidón en las células infectadas e intersticiales tanto de la  $Z_{III}$  como de la  $Z_{IV}$  (Figuras 3.21-3.24). En general, los amiloplastos fueron más visibles mediante microscopía óptica que los encontrados en los nódulos control, tanto en células de la  $Z_{III}$  (comparar Figuras 3.21A y 3.23A, B con Figura 3.19E-G), como en células de la  $Z_{IV}$  (comparar Figuras 3.21B, C y 3.23C con Figura 3.19I).

En las células infectadas, los amiloplastos ocupaban posiciones periféricas y presentaban gránulos de almidón con secciones alargadas de gran tamaño (Figuras 3.22A, B, G, I y 3.24B-D). En las células intersticiales, la acumulación de almidón fue incluso más notable que en las células infectadas. Los amiloplastos presentaban numerosos granos de almidón con secciones circulares de gran tamaño (Figuras 3.21A, B, 3.22C, H, J y 3.24E).

Así mismo, se observó una mayor acumulación de gránulos de almidón en algunas células de la corteza interna a lo largo de la sección del nódulo (Figuras 3.21C, 3.22E y 3.23E), en las células de la corteza próximas a los haces vasculares y en las propias células de transferencia (Figura 3.23D).

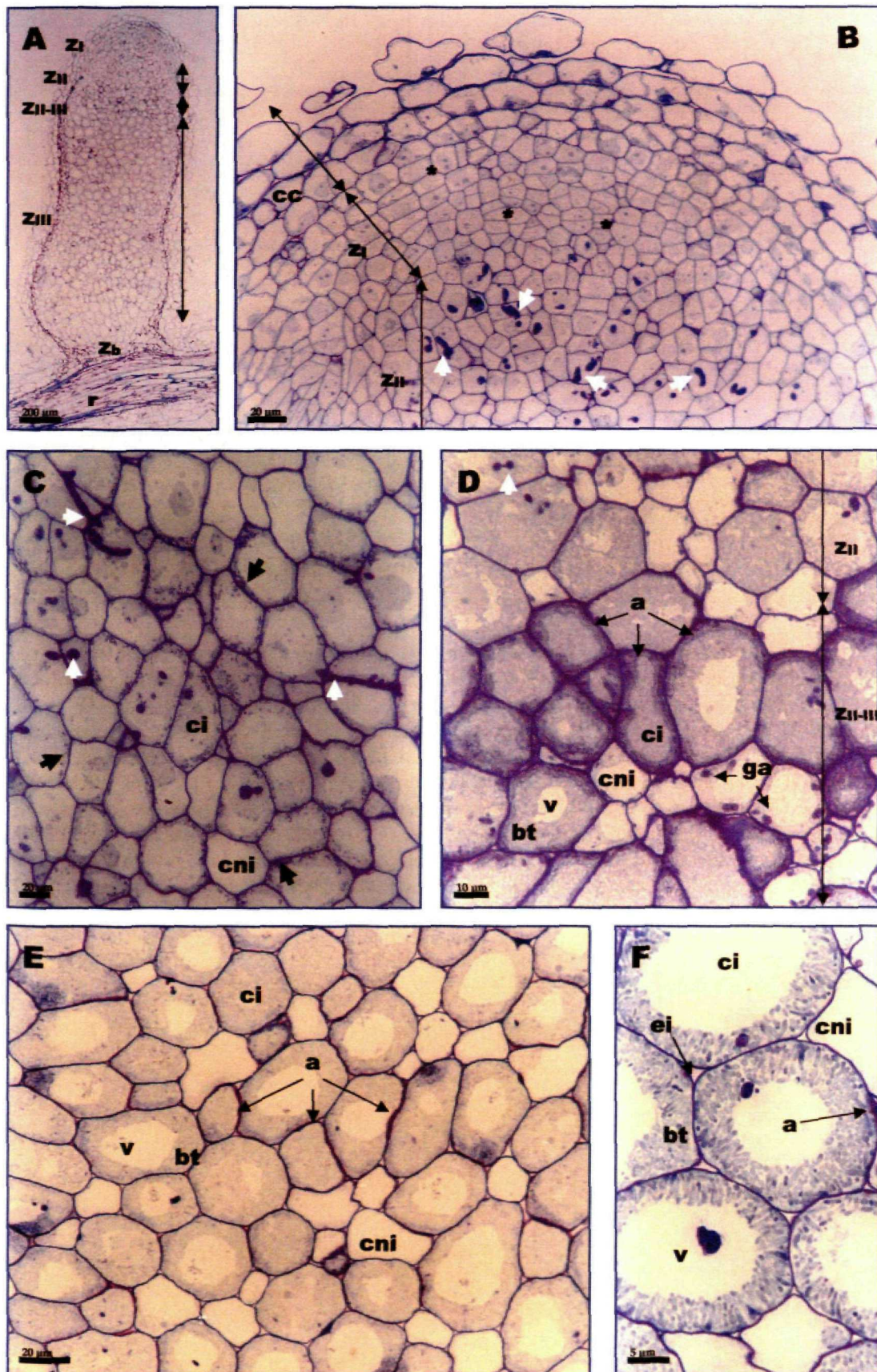
En el caso de los nódulos de 30 dpi y a diferencia de los nódulos control, aparentemente se observó una mayor presencia de cristales de ferritina en los plastidios de las células intersticiales y de la corteza en la  $Z_{III}$  (Figura 3.22F).

En estos nódulos de 30 dpi, la aparición de alteraciones ultraestructurales en los bacteroides de las células más proximales de la  $Z_{III}$  descritas en los nódulos control, fueron igualmente evidentes aunque estaban circunscritas a un menor número de capas de células (Figura 3.22J).

En los nódulos de 44 dpi, la zona  $Z_{IV}$  o de senescencia, no solo estaba aparentemente menos extendida que en los nódulos control, sino que además se



apreciaron menos alteraciones ultraestructurales relacionadas con la senescencia del nódulo o degeneración de los simbiosomas (Figura 3.24F). En las células senescentes más proximales de la zona  $Z_{IV}$ , algunos orgánulos seguían ocupando posiciones periféricas y las vacuolas mantenían formas más o menos regulares. No obstante, aparentemente, no hubo diferencias en el número de peroxisomas o en la aparición de formas alargadas de mitocondrias. En estas células, se encontraron simbiosomas poco alterados que conservaban la integridad de sus membranas y en los que únicamente se apreciaba un engrosamiento del espacio periplásmico. Junto a estos simbiosomas se observaron otros más alterados con las membranas peribacteroidales fusionadas y con los bacteroides colapsados (Figura 3.24F).







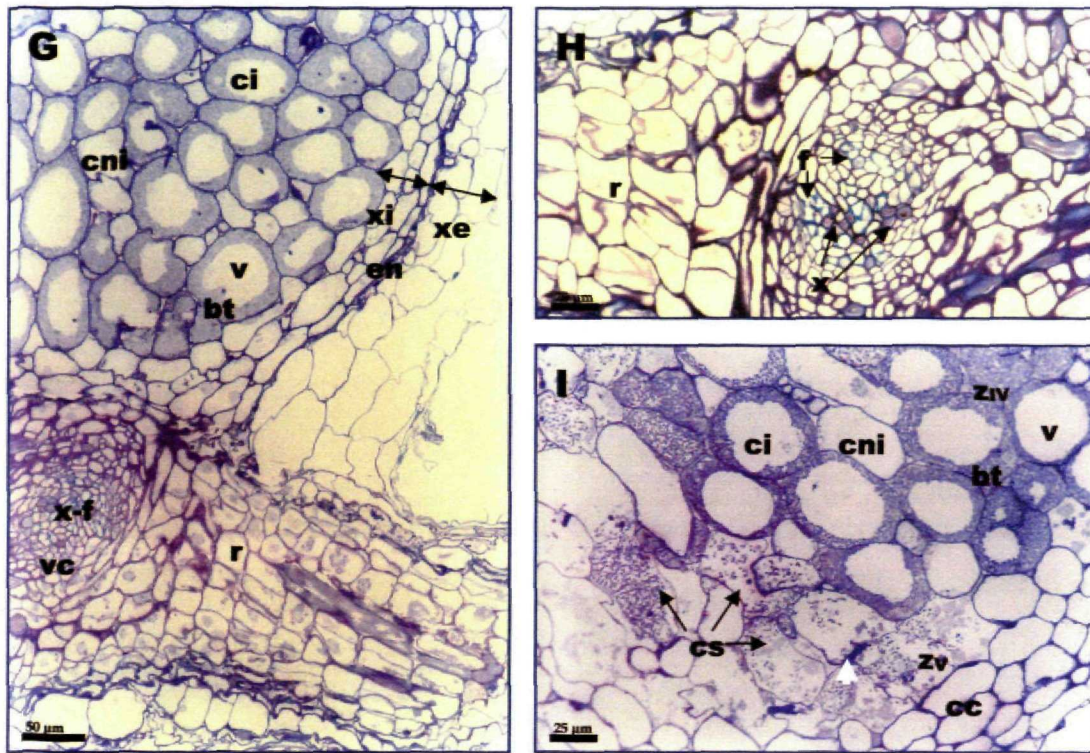
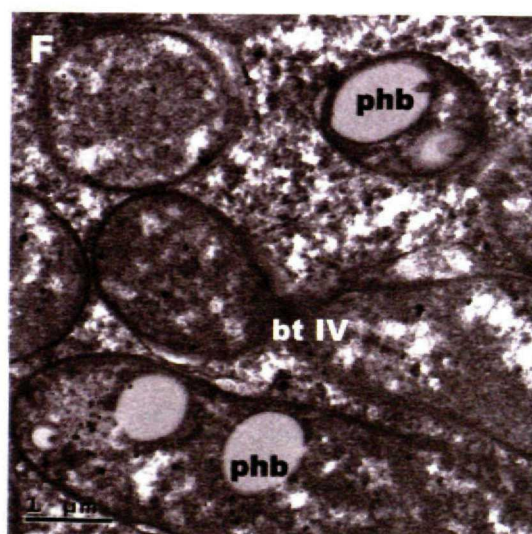
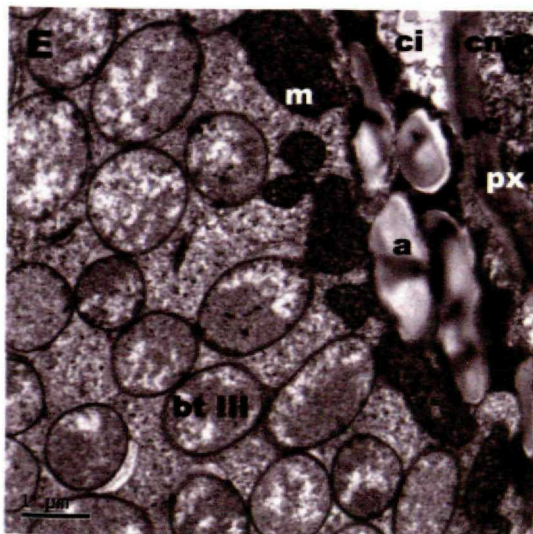
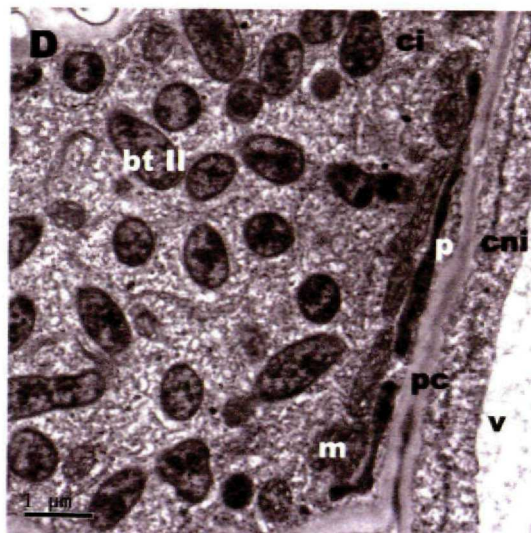
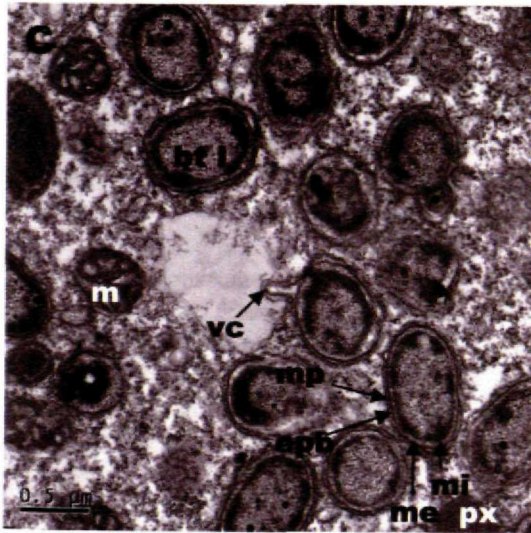
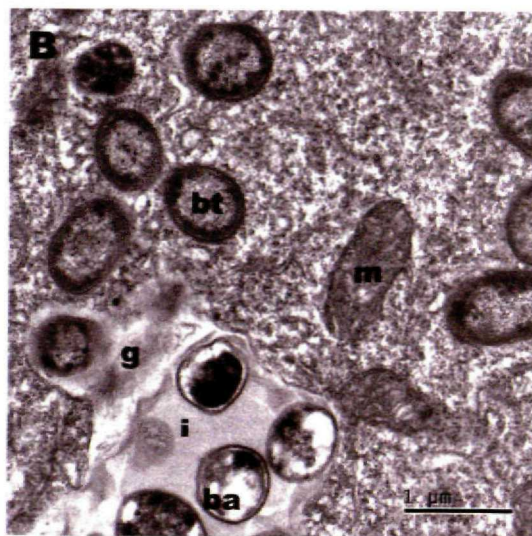
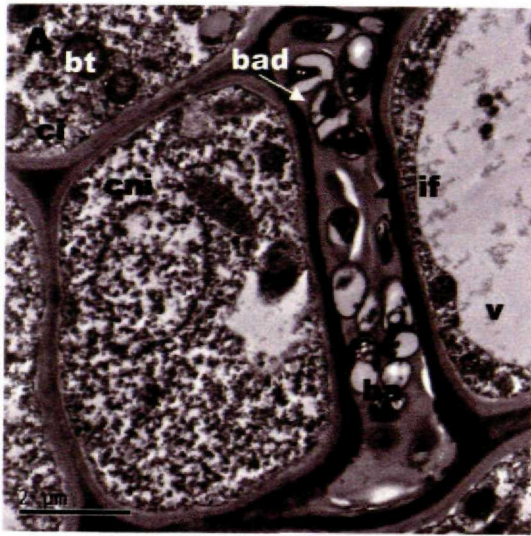


Figura 3.19. *Microfotografías ópticas de la estructura de los nódulos control*. Secciones de nódulos de plantas de *Medicago sativa* inoculadas con *Sinorhizobium meliloti* control (wt) (10, 30 y 44 dpi) estudiadas mediante microscopía óptica. Inclusiones en LR-White con polimerización a 60° C (A-E, G-H) ó a -20° C con luz UV (F, I). (A) Nódulo de 10 dpi; (B) Detalle de la zona apical de nódulo de 30 dpi: Corteza, meristemo ( $Z_I$ ) y zona de invasión ( $Z_{II}$ ); (C) Detalle de la  $Z_{II}$  (44dpi); (D) Detalle de la interzona  $Z_{II-III}$ ; (E-F) Detalles de la zona de fijación ( $Z_{III}$ ) en nódulos de 30 y 44 dpi respectivamente; (G) Detalle de la zona basal de nódulo de 30 dpi; (H) Detalle de vaso (30 dpi); (I) Detalle de la zona de senescencia ( $Z_{IV}$  y  $Z_V$ ) (44 dpi). a: amiloplasto; bt o flechas negras: bacteroides; cc: célula de la corteza; ci: célula infectada; cni: célula no infectada o intersticial; cs: célula senescente; en: endodermis; f: floema; ga: gránulo de almidón en a; r: raíz; v: vacuola; vc: vaso central; x: xilema; xe: cortex externo; xi: cortex interno; estrellas negras: divisiones celulares; flechas blancas: canales de infección.







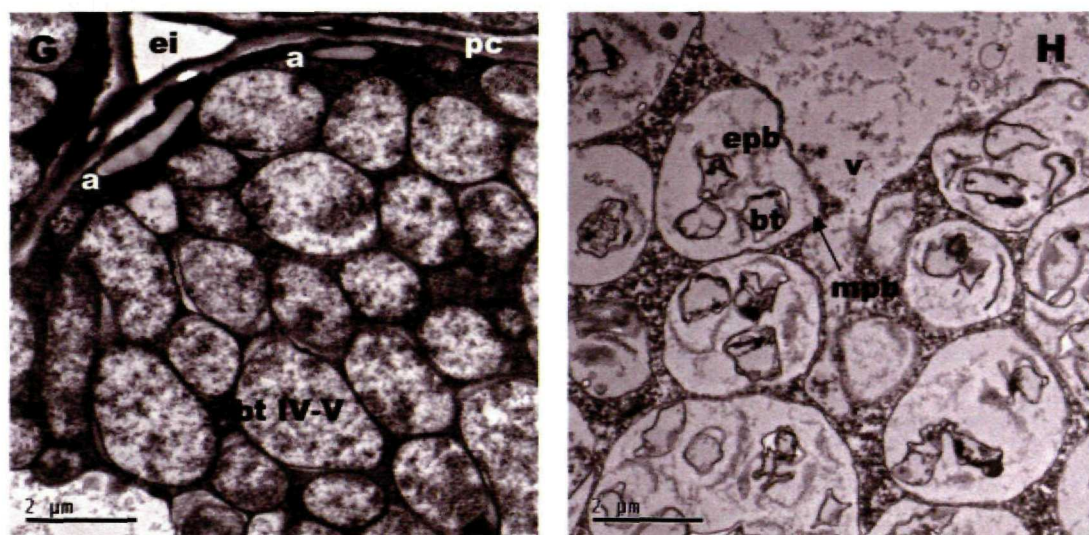


Figura 3.20. *Microfotografías electrónicas de la ultraestructura de los nódulos control.* Secciones de nódulos de plantas de *Medicago sativa* inoculadas con *Sinorhizobium meliloti* control (wt) (30 y 44 dpi) estudiadas mediante microscopía electrónica de transmisión. Inclusiones en LR-White con polimerización a 60° C. (A) Canal de infección entre células (30 dpi); (B) Liberación de bacterias (30 dpi); (C) Bacteroides liberados en zona de invasión ( $Z_{II}$ ); (D) Bacteroides en  $Z_{II}$  proximal (44 dpi); (E) Bacteroides en interzona ( $Z_{II-III}$ ) (30 dpi); (F) Bacteroides en zona de fijación ( $Z_{III}$ ) proximal (44 dpi); (G) Bacteroides en  $Z_{III}$  basal (30 dpi); (H) Célula senescente ( $Z_{IV}$ ) con simbiosomas en degeneración (44 dpi). a: amiloplasto; ba: bacteria; bad: bacteria en división; bt: bacteroides; bt I-V: tipos de bacteroides; ci: célula invadida; cni: célula no invadida o intersticial; ei: espacio intercelular; epb: espacio peribacteroidal; if: canal de infección; g: gota de infección; ga: gránulo de almidón en a; m: mitocondria; me y mi: membranas externa e interna del bacteroide; mp: membrana peribacteroidal; p: plastidio; pc: pared celular; phb: polihidroxibutirato; px: peroxisoma; v: vacuola; vc: vesícula citoplásmica.



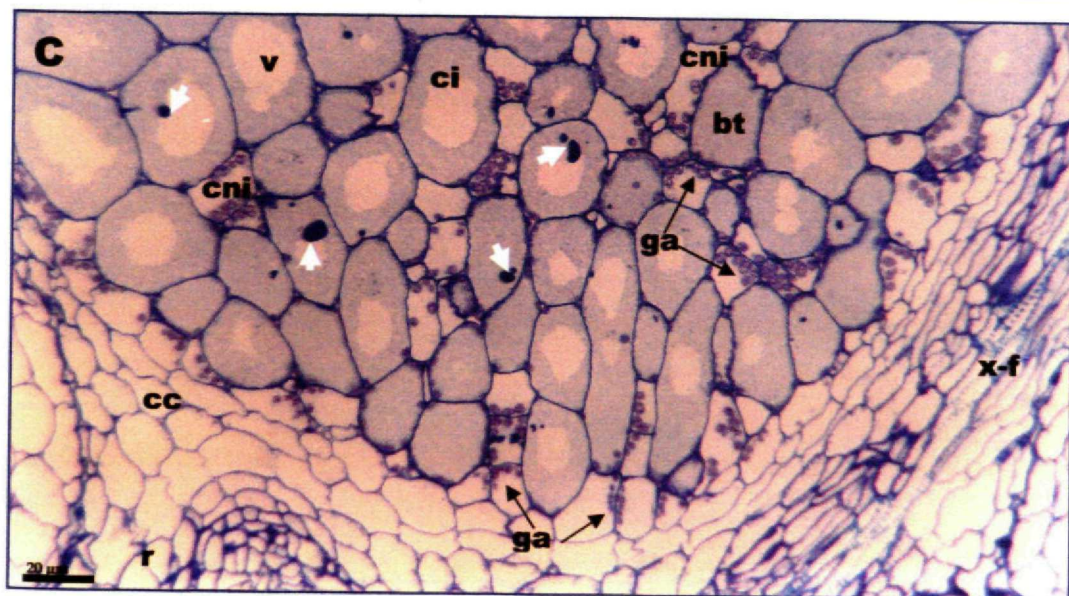
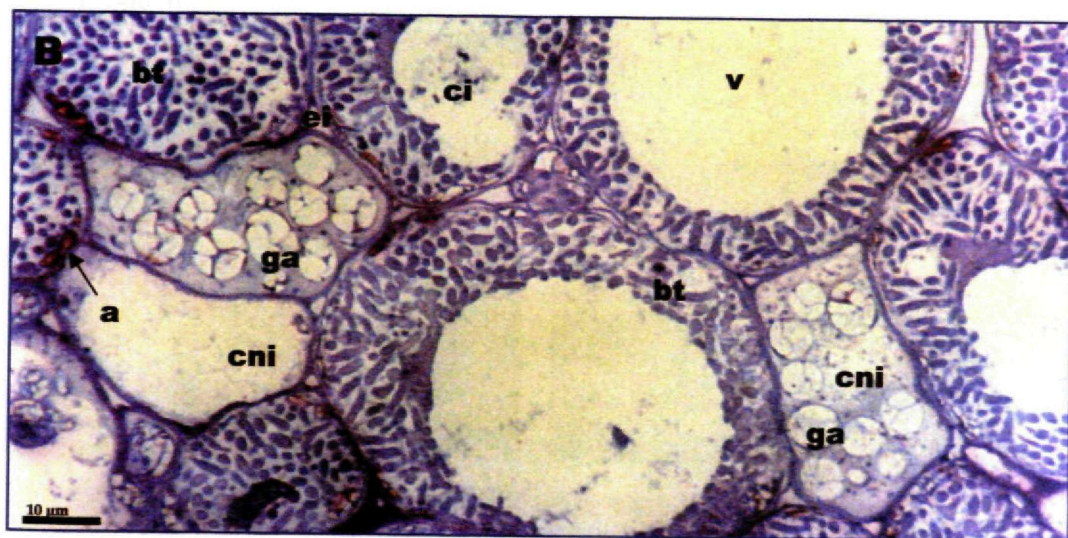
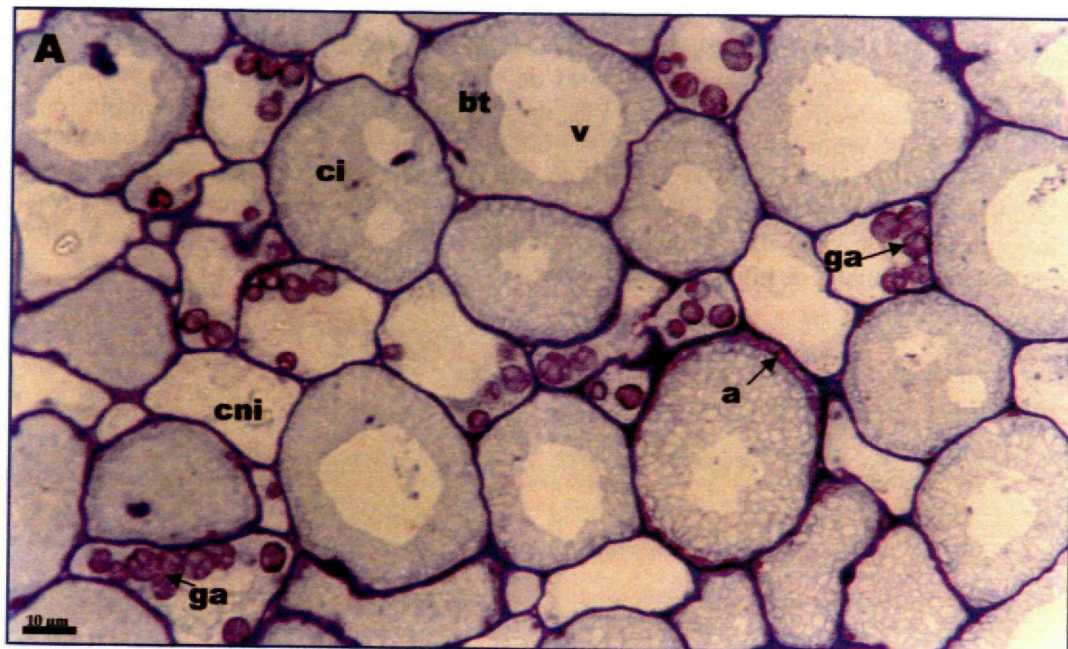
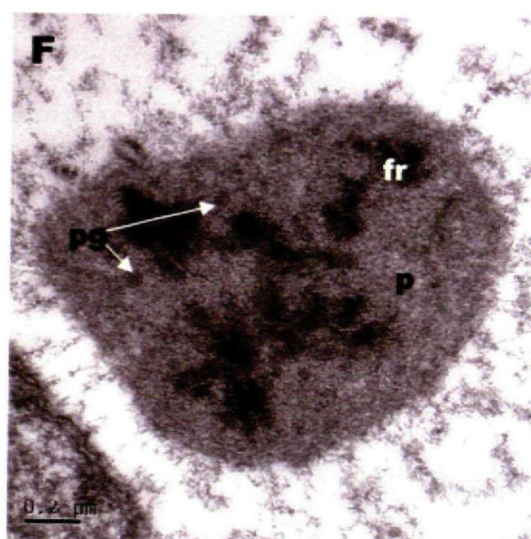
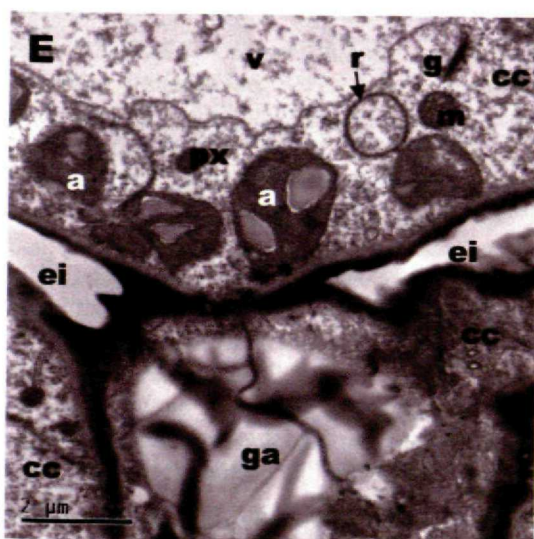
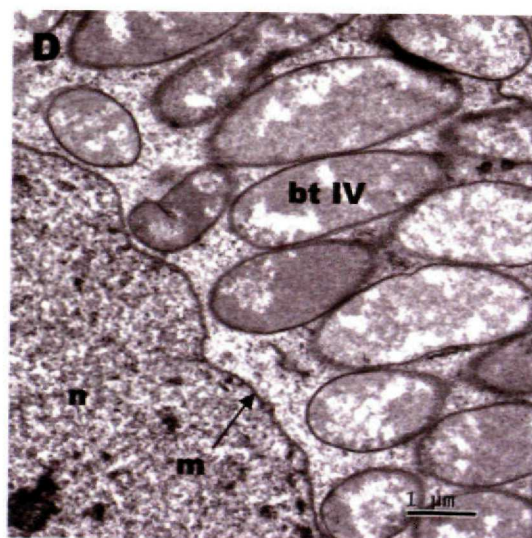
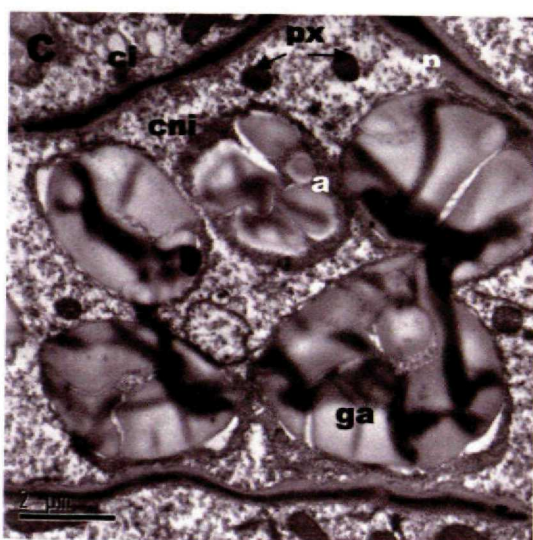
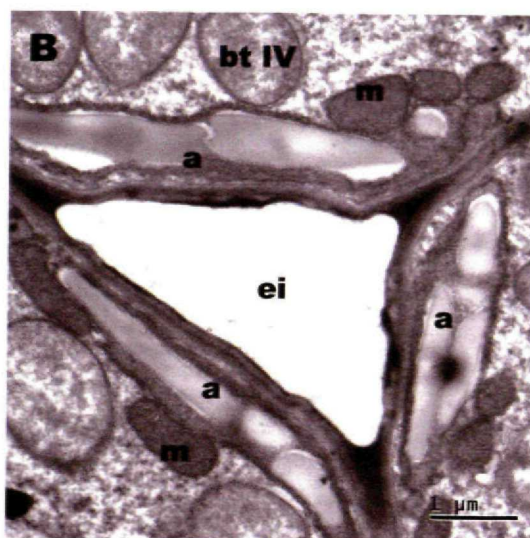
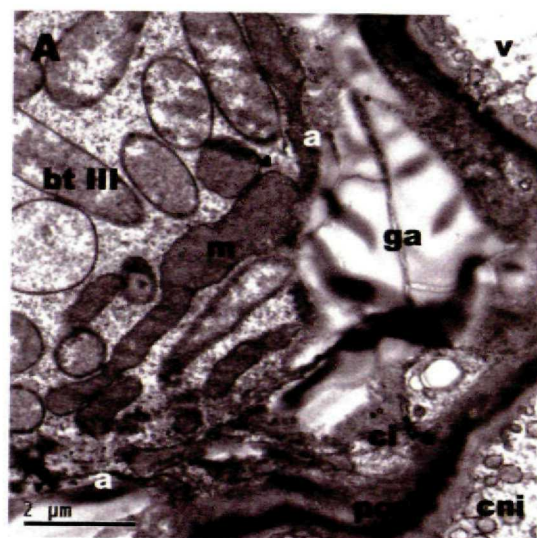


Figura 3.21. **Microfotografías ópticas de la estructura de los nódulos cuyos bacteroides expresan flavodoxina.** Secciones de nódulos de plantas de *Medicago sativa* inoculadas con *Sinorhizobium meliloti* pFAJ1709-Fld (30 dpi) estudiadas mediante microscopía óptica. Inclusiones en LR-White con polimerización a 60° C (A,C) ó -20° C con luz UV (B). (A) Detalle de la zona de fijación (Z<sub>III</sub>); (B) Detalle de células en la zona basal; (C) Zona basal. a: amiloplasto; bt: bacteroides; cc: célula de la corteza; ci: célula invadida; cni: célula no invadida o intersticial; ga: gránulo de almidón en plastidios; f: floema; r: raíz; v: vacuola; x: xilema; flechas blancas: canales de infección remanentes.







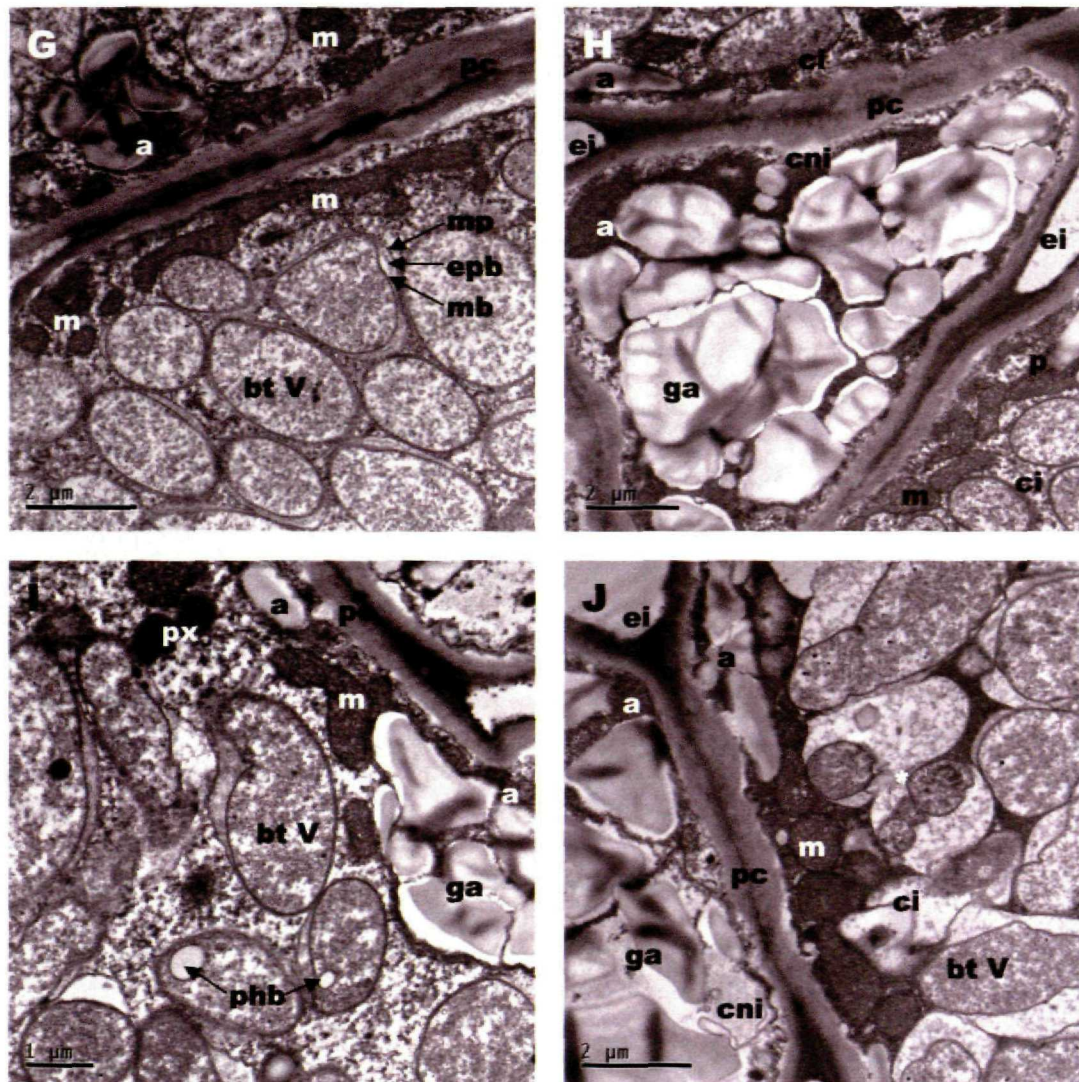


Figura 3.22. *Microfotografías electrónicas de la estructura de los nódulos cuyos bacteroides expresan flavodoxina*. Secciones de de nódulos de plantas de *Medicago sativa* inoculadas con *Sinorhizobium meliloti* pFAJ1709-F1d (30 dpi) estudiadas mediante microscopía electrónica de transmisión. Inclusiones en LR-White con polimerización a 60° C. (A) Bacteroides en interzona (Z<sub>II-III</sub>); (B) Detalle de células invadidas en zona de fijación (Z<sub>III</sub>); (C) Detalle de célula no invadida en Z<sub>III</sub> distal; (D) Bacteroides en zona Z<sub>III</sub> distal; (E) Detalle de células de la corteza en Z<sub>III</sub>; (F) Plastidio con ferritina en célula intersticial de Z<sub>III</sub>; (G) Bacteroides en zona Z<sub>III</sub> proximal; (H) Detalle de célula no invadida en Z<sub>III</sub> proximal; (I-J) Detalle de células invadidas y no invadidas en Z<sub>IV</sub>. a: amiloplasto; bt: bacteroides; bt III-V: tipos de bacteroides (Vasse *et al.*, 1990); cc: célula de la corteza; ci: célula invadida; cni: célula no invadida o intersticial; ei: espacio intercelular; epb: espacio peribacteroidal; g: aparato de Golgi; ga: gránulo de almidón en a; m: mitocondria; mb: membrana del bacteroide; mn: membrana nuclear; mp: membrana peribacteroidal; n: núcleo; p: plastidio; pc: pared celular; phb: polihidroxitubirato; px: peroxisoma; re: retículo endoplásmico; v: vacuola; estrella blanca: fusión de simbiosomas.



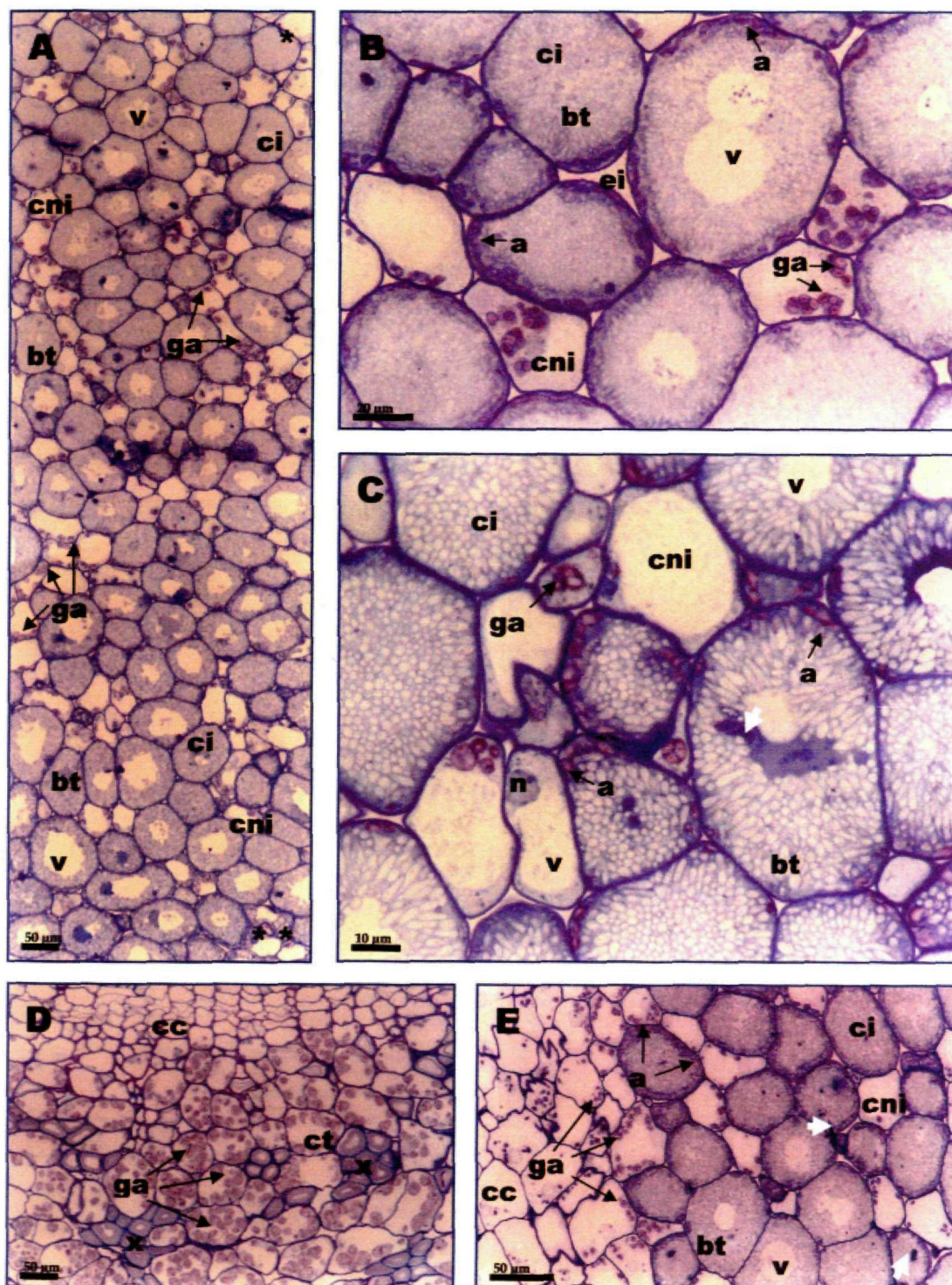


Figura 3.23. *Microfotografías ópticas de la estructura de los nódulos cuyos bacteroides expresan flavodoxina*. Secciones de nódulos de plantas de *Medicago sativa* inoculadas con *Sinorhizobium meliloti* pFAJ1709-Fld (44 dpi) estudiadas mediante microscopía óptica. Inclusiones en LR-White con polimerización a 60°C (A-B, D-E) ó -20° C con luz UV (C). (A) Detalle de la zona de fijación ( $Z_{III}$ ) distal (\*) proximal (\*\*); (B) Detalle de células de  $Z_{III}$ ; (C) Detalle de células de zona basal ( $Z_{IV}$ ); (D) Zona basal y vaso central; (E) Detalle de células de corteza en  $Z_{III}$ . a: amiloplasto; bt: bacteroides; cc: célula de la corteza; ci: célula invadida; cni: célula no invadida o intersticial; ct: células de transferencia; ga: gránulo de almidón en a; n: núcleo; v: vacuola; r: raíz; x: xilema; flechas blancas: canales de infección remanentes.



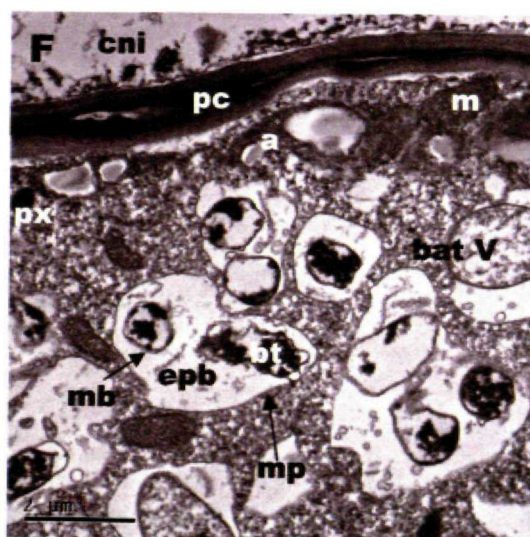
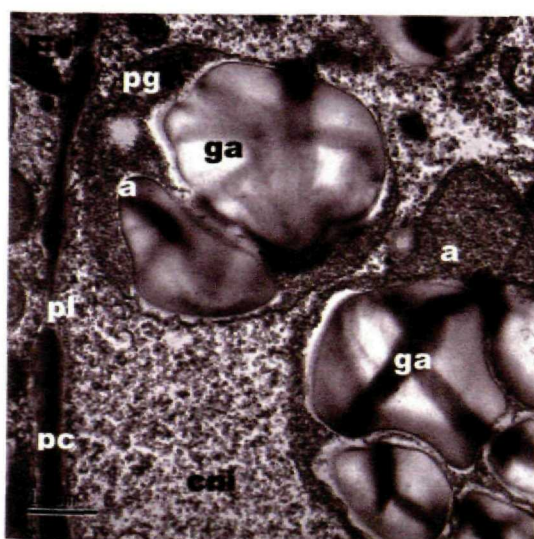
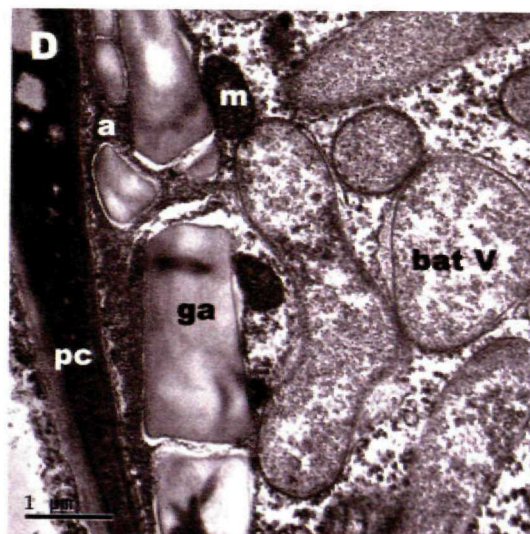
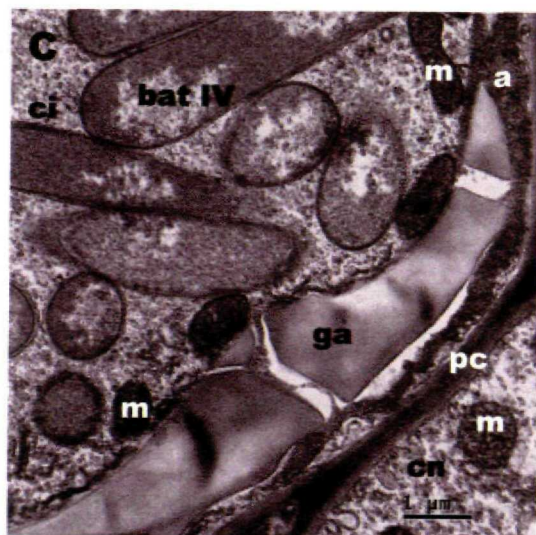
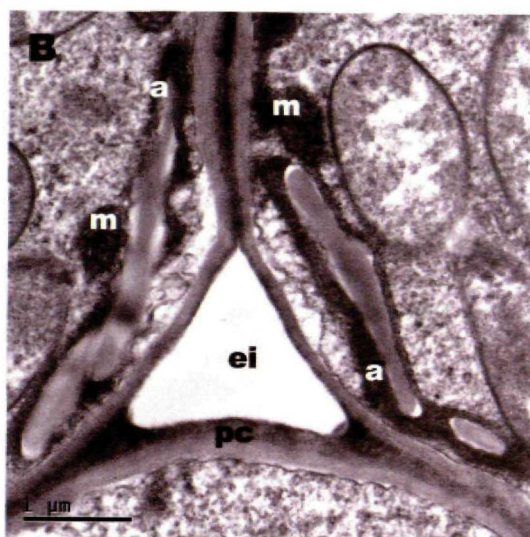
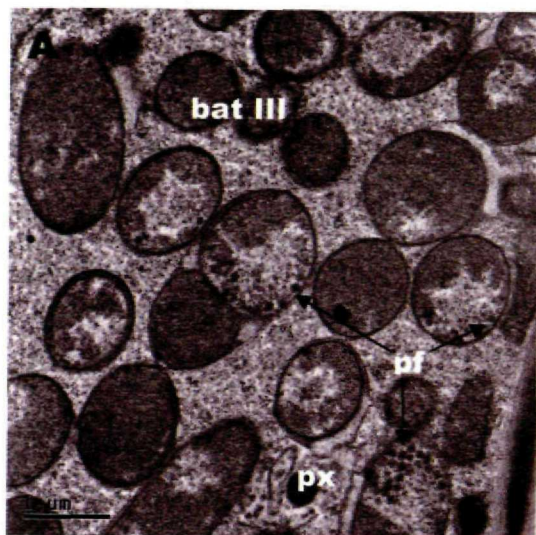




Figura 3.24. **Microfotografías electrónicas de la estructura de los nódulos cuyos bacteroides expresan flavodoxina.** Secciones de nódulos de plantas de *Medicago sativa* inoculadas con *Sinorhizobium meliloti* pFAJ1709-Fld (44 dpi) estudiadas mediante microscopía electrónica de transmisión. Inclusiones en LR-White con polimerización a 60° C. (A) Bacteroides en interzona ( $Z_{II-III}$ ); (B-C) Detalle de células invadidas en zona de fijación ( $Z_{III}$ ); (D) Bacteroides en zona  $Z_{III}$  proximal; (E) Detalle de célula no invadida en  $Z_{III}$  proximal; (F) Detalle de células senescentes ( $Z_{IV}$ ). a: amiloplasto; bt: bacteroides; bt III-V: tipos de bacteroides (Vasse *et al.*, 1990); ci: célula invadida; cni: célula no invadida o intersticial; ei: espacio intercelular; epb: espacio peribacteroidal; ga: gránulo de almidón en a; m: mitocondrias; mb: membrana del bacteroide; mp: membrana peribacteroidal; pc: pared celular; pf: gránulos de polifosfato; pl: plasmodesmo.

#### 4. Efecto de la expresión de flavodoxina en bacteroides de nódulos de plantas de *Medicago sativa* sometidas a estrés salino

Se estudió el efecto de la expresión y acumulación de la proteína flavodoxina en los bacteroides de *Sinorhizobium meliloti* de nódulos de *Medicago sativa* sometidos a estrés salino, sobre la nodulación, la capacidad fijadora de nitrógeno, el metabolismo oxidativo y carbonado y la estructura y ultraestructura del nódulo.

##### 4.1. Nodulación en condiciones de salinidad

Se estudió el efecto de la flavodoxina sobre la capacidad simbiótica de las bacterias mediante ensayos de nodulación de *Sinorhizobium meliloti* 2011 (wt, pFAJ1709 y pFAJ1709-Fld) en plantas de *Medicago sativa* sometidas a estrés salino (10, 25, 50 y 100 mM NaCl) (Tabla 3.2).

No se observaron diferencias significativas en el número de nódulos entre los diferentes inóculos para ninguno de los tiempos post-inoculación estudiados. A los 7 dpi el número de nódulos de las plantas de *Medicago sativa* en presencia de NaCl 100 mM fue significativamente menor con respecto al resto de los tratamientos (NaCl 0, 10, 25 y 50 mM). A los 11 dpi en presencia de NaCl 50 y 100 mM el número de nódulos fue significativamente menor con respecto a la situación control y a la concentración menor (NaCl 10 mM). Ya a los 15 dpi, el número de nódulos de las plantas de *Medicago sativa* en presencia de NaCl 50 y 100 mM fue significativamente menor con respecto al resto de los tratamientos (NaCl 0, 10 y 25 mM). No hubo diferencias significativas en el número de nódulos formados a lo largo de los días post-inoculación estudiados, en las plantas de *Medicago sativa* en presencia de NaCl 50 y 100 mM.

■	<i>Medicago sativa</i> + <i>S.meliloti</i> wt
■	<i>Medicago sativa</i> + <i>S.meliloti</i> pFAJ1709
■	<i>Medicago sativa</i> + <i>S.meliloti</i> pFAJ1709-Fld

NaCl	7 DPI	7 DPI	7 DPI	9 DPI	9 DPI	9 DPI
0 mM	3,60 ±0,49	4,57 ±0,48	4,67 ±0,48	6,05 ±0,49	6,13 ±0,47	5,54 ±0,47
10 mM	4,69 ±0,6	4,25 ±0,64	3,21 ±0,59	5,83 ±0,64	4,71 ±0,59	4,57 ±0,59
25 mM	3,61 ±0,51	4,00 ±0,47	4,26 ±0,51	4,22 ±0,52	3,96 ±0,47	4,79 ±0,51
50 mM	4,56 ±0,52	3,76 ±0,48	3,19 ±0,55	4,50 ±0,52	3,96 ±0,47	3,15 ±0,49
100 mM	2,05 ±0,48	2,54 ±0,66	1,71 ±0,59	2,52 ±0,48	2,58 ±0,63	1,76 ±0,53



NaCl	11 DPI	11 DPI	11 DPI	13 DPI	13 DPI	13 DPI
0 mM	5,35 ±0,49	6,09 ±0,47	5,71 ±0,48	6,00 ±0,59	6,28 ±0,59	6,35 ±0,49
10 mM	6,15 ±0,61	5,00 ±0,59	6,00 ±0,63	6,27 ±0,57	5,42 ±0,59	5,54 ±0,61
25 mM	4,55 ±0,52	4,50 ±0,47	5,26 ±0,51	4,72 ±0,52	5,45 ±0,47	5,25 ±0,49
50 mM	4,45 ±0,47	4,19 ±0,48	3,30 ±0,49	4,59 ±0,47	4,89 ±0,51	3,75 ±0,49
100 mM	3,19 ±0,48	2,57 ±0,59	2,50 ±0,59	3,19 ±0,48	2,57 ±0,59	2,50 ±0,59

NaCl	15 DPI	15 DPI	15 DPI	17 DPI	17 DPI	17 DPI
0 mM	6,64 ±0,59	6,00 ±0,70	6,09 ±0,48	7,50 ±0,91	7,50 ±0,91	7,16 ±0,91
10 mM	6,27 ±0,57	5,93 ±0,59	6,14 ±0,59	7,00 ±0,65	6,73 ±0,68	6,91 ±0,65
25 mM	5,17 ±0,54	5,91 ±0,46	5,36 ±0,51	5,61 ±0,53	6,17 ±0,53	5,82 ±0,55
50 mM	5,26 ±0,51	4,57 ±0,51	3,90 ±0,49	5,56 ±0,53	5,89 ±0,53	5,33 ±0,53
100 mM	3,19 ±0,48	2,57 ±0,59	2,50 ±0,59	3,19 ±0,48	2,57 ±0,59	2,50 ±0,59

Tabla 3.2. *Nodulación en condiciones de salinidad*. Ensayos de nodulación en plantas de *Medicago sativa* cv. Aragon-R1 inoculadas con *Sinorhizobium meliloti* 2011 (wt, pFAJ1709 y pFAJ1709-Fld) en presencia de NaCl (0-10-25-50-100 mM). No hubo diferencias significativas entre los inóculos. Los valores representan la media y desviación típica de los nódulos formados de 2 experimentos independientes.

4.2. Fijación de nitrógeno

Se evaluó la capacidad fijadora de nitrógeno de plantas de *Medicago sativa* inoculadas con *Sinorhizobium meliloti* 2011 (wt, pFAJ1709 y pFAJ1709-Fld) y sometidas a estrés salino, mediante ensayos de reducción de acetileno (ARA). Se aplicó una concentración 100 mM de NaCl durante 2, 3 y 4 días en plantas de 18 días donde la actividad nitrogenasa es máxima (ver Resultados 3.2). Se estimó la actividad nitrogenasa específica como  $\mu\text{moles}$  de acetileno reducidos por hora por gramo de nódulo fresco ( $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) (Figura 3.25).

No hubo diferencias significativas entre los diferentes nódulos de las plantas de 20 días crecidas en condiciones control (18d + 2d 0 mM) (28,9 - 30,2 mM  $\text{C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ). En las plantas sometidas al estrés salino, se observó una bajada en la actividad nitrogenasa de un 40% ( $p \leq 0,05$ ) en los nódulos control (wt y pFAJ1709) y de un 25% ( $p \leq 0,05$ ) en los nódulos cuyos bacteroides expresan y acumulan la flavodoxina con respecto a los mismos nódulos crecidos en condiciones control. Aunque la reducción de acetileno de los nódulos de las plantas inoculadas con *Sinorhizobium meliloti* pFAJ1709-Fld y crecidas en condiciones de salinidad (18d + 2d 100 mM) (22,7 mM

$\text{C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) fue mayor que la de los nódulos control crecidos en las mismas condiciones ( $18 \text{ mM C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ), no hubo diferencias significativas.

En las plantas de 21 días, no hubo diferencias significativas en la reducción de acetileno de los diferentes nódulos crecidos en condiciones control ( $18\text{d} + 3\text{d } 0 \text{ mM}$ ) ( $31,3 - 34,1 \text{ mM C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ). En las plantas sometidas al estrés salino, se observó un descenso en la actividad nitrogenasa de un 60% ( $p \leq 0,05$ ) en los nódulos control y un 40% ( $p \leq 0,05$ ) en los nódulos que incluyen los bacteroides que expresan y acumulan la flavodoxina con respecto a los mismo nódulos crecidos en condiciones control. En este caso, la reducción de acetileno de los nódulos de las plantas inoculadas con *Sinorhizobium meliloti* pFAJ1709-Fld y crecidas en condiciones de salinidad ( $18\text{d} + 3\text{d } 100 \text{ mM}$ ) ( $22,1 \text{ mM C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ), fue significativamente mayor que la de los nódulos control crecidos en las mismas condiciones ( $16 \text{ mM C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ).

En las plantas de 22 días tampoco hubo diferencias significativas en la reducción de acetileno de los diferentes nódulos crecidos en condiciones control ( $18\text{d} + 4\text{d } 0 \text{ mM}$ ) ( $31,6 - 35,4 \text{ mM C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ). La disminución de la actividad nitrogenasa entre los nódulos crecidos en condiciones control y los nódulos crecidos en condiciones de salinidad ( $18\text{d} + 4\text{d } 100 \text{ mM}$ ) fue de un 73% ( $p \leq 0,05$ ) para los nódulos control y un 60% ( $p \leq 0,05$ ) para los nódulos que incluyen los bacteroides que expresan y acumulan la flavodoxina. De nuevo la reducción de acetileno de los nódulos de las plantas inoculadas con *Sinorhizobium meliloti* pFAJ1709-Fld y crecidas en condiciones de salinidad ( $18\text{d} + 4\text{d } 100 \text{ mM}$ ) ( $13,8 \text{ mM C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ), fue significativamente mayor que la de los nódulos control crecidos en las mismas condiciones ( $8,8 \text{ mM C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ).

El mantenimiento de las condiciones de salinidad durante 1 día, supuso un caída del 10 % entre los nódulos control de 20 y 21 días ( $18$  y  $16 \text{ mM C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) y una caída del 2,5 % entre los nódulos que acumulan flavodoxina de 20 y 21 días ( $22,7$  y  $22,1 \text{ mM C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ). Sin embargo, el mantenimiento de las condiciones de salinidad durante un 2º día más supuso un caída del 45 % entre los nódulos control de 21 y 22 días ( $16$  y  $8,8 \text{ mM C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) y una caída del 38 % entre los nódulos que acumulan flavodoxina de 21 y 22 días ( $22,1$  y  $16 \text{ mM C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ).

Se estudiaron posibles variaciones en el peso de la parte aérea de la planta y de los nódulos derivadas del efecto de flavodoxina sobre la capacidad fijadora de nitrógeno en plantas sometidas a estrés salino. No hubo diferencias significativas en el peso fresco y seco de la parte aérea de la planta y en el peso fresco de los nódulos, entre los diferentes inóculos (datos no mostrados).



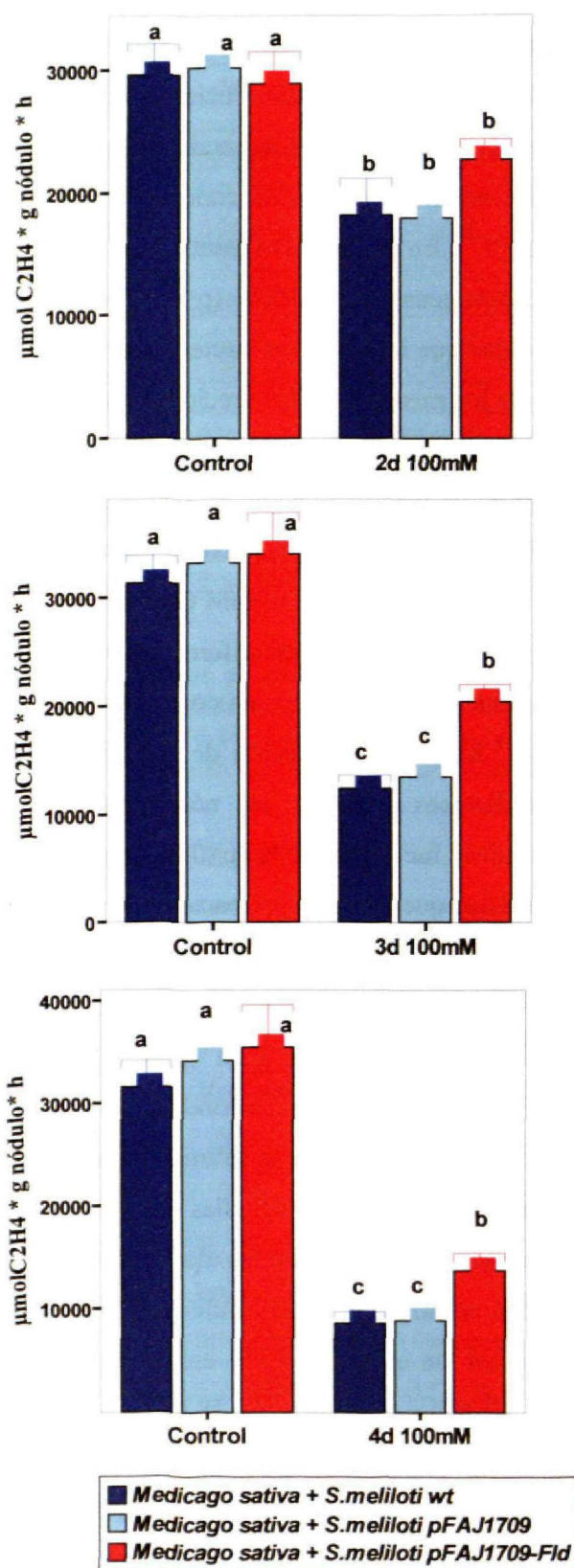


Figura 3.25. *Actividad fijadora de nitrógeno en condiciones de salinidad.* Ensayos de reducción de acetileno ( $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \text{ gr}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) en plantas de *Medicago sativa* cv. Aragon-R1 inoculadas con *Sinorhizobium meliloti* 2011 (wt, pFAJ1709 y pFAJ1709-Fld) y tratadas a los 18 días con NaCl 100 mM 2, 3 y 4 días. Los valores representan la media y las barras de error la desviación típica de la media. Los datos proceden de 3 experimentos independientes. Las diferencias significativas se representan con diferentes letras ( $p \leq 0.05$ ; LSD).

### 4.3. Metabolismo oxidativo

Se analizaron la actividad superóxido dismutasa y catalasa y se determinaron las principales actividades, metabolitos e índices del ciclo ascorbato-glutation.

Se determinó la actividad superóxido dismutasa en nódulos de plantas de *Medicago sativa* inoculadas con *Sinorhizobium meliloti* 2011 (pFAJ1709 y pFAJ1709-Fld) y sometidas a estrés salino (18d + 3d 100 mM NaCl). Se expresó la actividad específica como unidades por mg de proteína o mg de peso seco de nódulo (Figura 3.26A y Tabla 3.3).

No hubo diferencias significativas en las estimaciones de la actividad SOD entre ambos tipos de nódulos en condiciones control (18d + 3d 0 mM NaCl) ni entre los sometidos al estrés salino (18d + 3d 100 mM NaCl). Se observó un descenso leve pero significativo de la actividad SOD por efecto del estrés salino, tanto en los nódulos cuyos bacteroides expresan flavodoxina (9-21%) como en los nódulos control (12-30%).

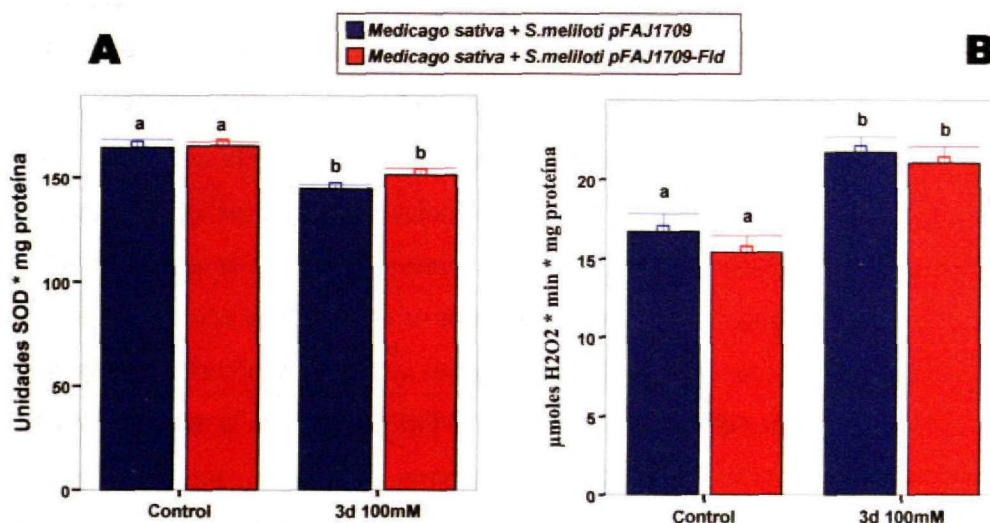


Figura 3.26. *Actividades superóxido dismutasa y catalasa.* Determinación de la actividad SOD (A) y CAT (B) en nódulos de plantas de *Medicago sativa* cv. Aragon-R1 inoculadas con *Sinorhizobium meliloti* 2011 (pFAJ1709 y pFAJ1709-Fld) y sometidas a estrés salino (18d + 3d 100 mM NaCl). La actividad específica se relativizó a mg de proteína. Los valores representan la media de 5 determinaciones y las barras de error la desviación típica de la media. Las diferencias significativas están representadas con diferentes letras ( $p \leq 0.05$ ; LSD).

Se determinó la actividad catalasa en nódulos de plantas de *Medicago sativa* inoculadas con *Sinorhizobium meliloti* 2011 (pFAJ1709 y pFAJ1709-Fld) y sometidas a estrés salino (18d + 3d 100 mM NaCl). Se expresó la actividad específica como  $\mu$ moles



de  $\text{H}_2\text{O}_2$  oxidados por minuto y mg de proteína o g de peso seco de nódulo (Figura 3.26B y Tabla 3.3).

No se observaron diferencias significativas en las estimaciones de la actividad catalasa entre ambos tipos de nódulos en la situación control (18d + 3d 0 mM NaCl) ni entre los sometidos al estrés salino (18d + 3d 100 mM NaCl). Se observó un incremento significativo de la actividad catalasa en presencia del estrés salino, similar en ambos tipos de nódulos (aproximadamente 30% de incremento).

Se determinaron las principales actividades del ciclo ascorbato-glutation: ascorbato peroxidasa, monodehidroascorbato reductasa, dehidroascorbato reductasa y glutathione reductasa (Figura 3.27 y Tabla 3.3), se midió el contenido de glutathione oxidado y reducido y se calcularon los balances redox para el glutathione (Figura 3.28 y Tabla 3.3) en los nódulos de plantas de *Medicago sativa* inoculadas con *Sinorhizobium meliloti* 2011 (pFAJ1709 y pFAJ1709-Fld) y sometidas a estrés salino (18d + 3d 100 mM NaCl).

Se determinó la actividad APX y se expresó la actividad específica como nmoles de ácido ascórbico oxidados por minuto y mg de proteína o  $\mu\text{moles}$  de ácido ascórbico oxidados por minuto y g de peso seco de nódulo (Figura 3.27A y Tabla 3.3). En condiciones control (18d + 3d 0 mM NaCl), la actividad APX fue mayor en los nódulos de las plantas inoculadas con *Sinorhizobium meliloti* pFAJ1709-Fld que en los nódulos control (pFAJ1709), no obstante no hubo diferencias significativas en ninguna de las estimaciones de la actividad APX. Se observó un descenso en la actividad APX en presencia del estrés salino. En los nódulos control se observó una caída en la actividad APX de aproximadamente 30% ( $p \leq 0,05$ ) mientras que en los nódulos de las plantas inoculadas con *Sinorhizobium meliloti* pFAJ1709-Fld, la caída en la actividad APX fue de aproximadamente 22% ( $p \leq 0,05$ ). Se apreciaron diferencias significativas en la actividad APX de los nódulos sometidos al estrés salino. Los nódulos cuyos bacteroides expresan la flavodoxina presentaban aproximadamente un 17% más de actividad APX que los nódulos control.

Se determinó la actividad MDHAR y se expresó la actividad específica como nmoles de NADH oxidados por minuto y mg de proteína o  $\mu\text{moles}$  de NADH oxidados por minuto y g de peso seco de nódulo (Figura 3.27B y Tabla 3.3). No se observaron diferencias significativas en las estimaciones de la actividad MDHAR entre ambos tipos de nódulos en la situación control (18d + 3d 0 mM NaCl) ni entre los sometidos al

estrés salino (18d + 3d 100 mM NaCl). Se observó un descenso significativo de la actividad MDHAR en presencia del estrés salino similar en ambos tipos de nódulos.

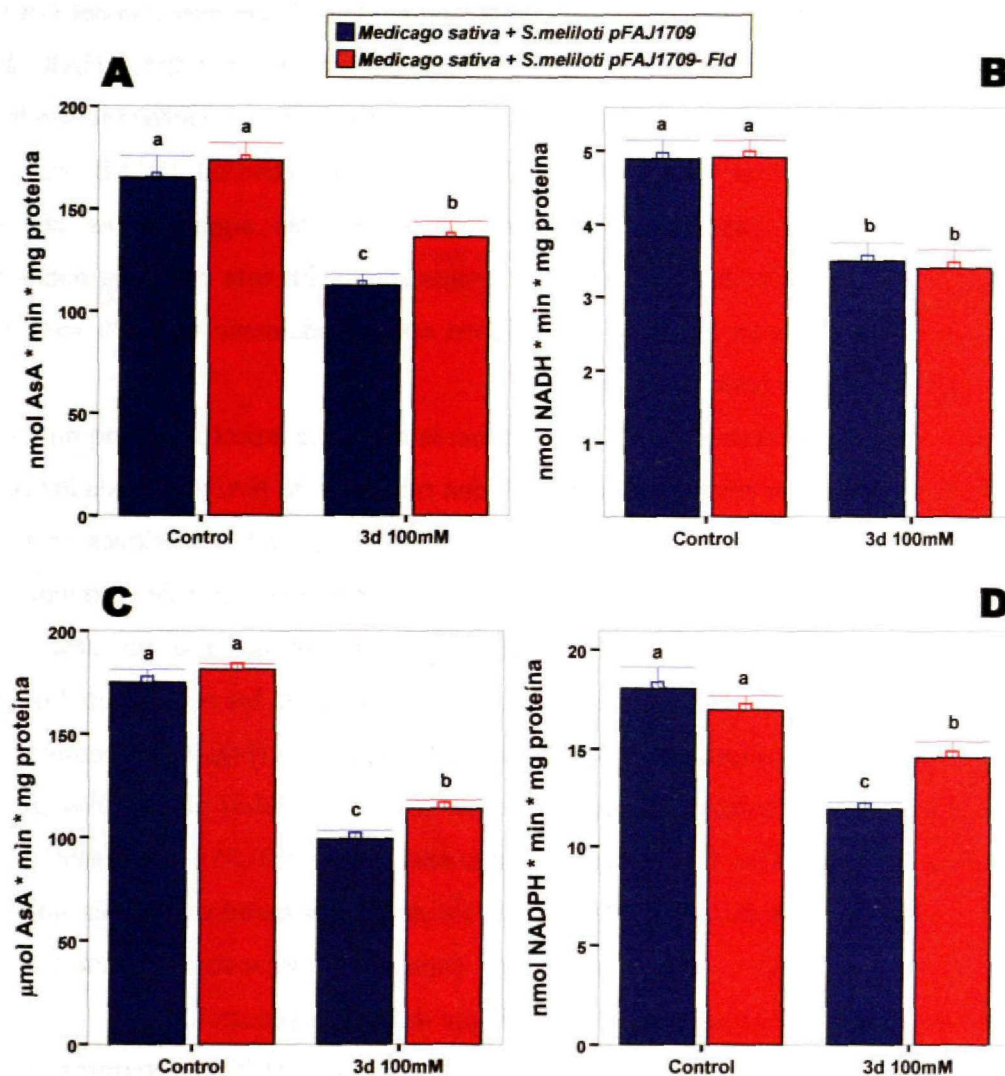


Figura 3.27. *Actividades enzimáticas del ciclo ascorbato-glutation*. Determinaciones enzimáticas en nódulos de plantas de *Medicago sativa* cv. Aragon-R1 inoculadas con *Sinorhizobium meliloti* 2011 (pFAJ1709 y pFAJ1709-Fld) y sometidas a estrés salino (18d + 3d 100 mM NaCl). (A) APX, ascorbato peroxidasa; (B) MDHAR, monodehidroascorbato reductasa; (C) DHAR, dehidroascorbato reductasa; (D) GR, glutatión reductasa. Las actividades específicas se relativizaron a mg de proteína. Los valores representan la media de 6 determinaciones y las barras de error la desviación típica de la media. Las diferencias significativas están representadas con diferentes letras ( $p \leq 0.05$ ; LSD).

Se determinó la actividad DHAR y se expresó la actividad específica como nmoles de ácido ascórbico oxidados por minuto y mg de proteína o  $\mu$ moles de ácido ascórbico oxidados por minuto y g de peso seco de nódulo (Figura 3.27C y Tabla 3.3).



En condiciones control la actividad DHAR fue mayor en los nódulos de las plantas inoculadas con *Sinorhizobium meliloti* pFAJ1709-Fld que en los nódulos control (pFAJ1709), no obstante no hubo diferencias significativas en las estimaciones de la actividad DHAR. Se observó un descenso en la actividad DHAR en presencia del estrés salino. En los nódulos control se observó una caída en la actividad DHAR de aproximadamente 45% ( $p \leq 0,05$ ) mientras que en los nódulos de las plantas inoculadas con *Sinorhizobium meliloti* pFAJ1709-Fld, la caída en la actividad DHAR fue de aproximadamente 35% ( $p \leq 0,05$ ). Se observaron diferencias significativas en la actividad DHAR de los nódulos sometidos al estrés salino. En este caso, los nódulos cuyos bacteroides expresan la flavodoxina tienen aproximadamente un 15% más de actividad DHAR que los nódulos control.

Se determinó la actividad GR y se expresó la actividad específica como nmoles de NADPH oxidados por minuto y mg de proteína o  $\mu$ moles de NADPH oxidados por minuto y g de peso seco de nódulo (Figura 3.27D y Tabla 3.3). En condiciones control la actividad GR fue mayor en los nódulos control, no obstante no hubo diferencias significativas en las estimaciones de la actividad GR. Se observó un descenso significativo en la actividad GR en presencia del estrés salino. En los nódulos control se observó una caída en la actividad GR de aproximadamente 32% ( $p \leq 0,05$ ) mientras que en los nódulos de las plantas inoculadas con *Sinorhizobium meliloti* pFAJ1709-Fld, la caída en la actividad GR fue de aproximadamente 14% ( $p \leq 0,05$ ). Se observaron diferencias significativas en la actividad GR de los nódulos sometidos al estrés salino. En este caso, los nódulos cuyos bacteroides expresan la flavodoxina presentaron aproximadamente un 22% más de actividad GR que los nódulos control.

El contenido de glutatión reducido (GSH) y oxidado (GSSG) determinado se expresó como nmoles por mg de proteína o g de peso seco de nódulo y se calculó el balance redox del glutatión (GSH/GSSG) de ambas estimaciones (Figura 3.28 y Tabla 3.3).

En condiciones control, la cantidad de GSH fue ligeramente superior en los nódulos de las plantas inoculadas con *Sinorhizobium meliloti* pFAJ1709-Fld, aunque no hubo diferencias significativas con respecto a los nódulos control (Figura 3.28A y Tabla 3.3). Como consecuencia del tratamiento salino, se observó un descenso significativo en el contenido de GSH similar en ambos tipos de nódulos. No obstante, según la determinación de GSH en nmoles  $\text{mg}^{-1}$  de proteína, no hubo diferencias significativas entre los nódulos control crecidos en condiciones control y los nódulos cuyos

bacteroides expresan la flavodoxina, sometidos a estrés salino. En condiciones control, no hubo diferencias significativas en el contenido de GSSG entre los distintos nódulos (Figura 3.28B y Tabla 3.3). Se observó un incremento significativo (aproximadamente de 3 veces) en el contenido de GSSG en presencia del estrés salino en ambos tipos de nódulos. No obstante, la cantidad de GSSG fue significativamente superior en los nódulos control.

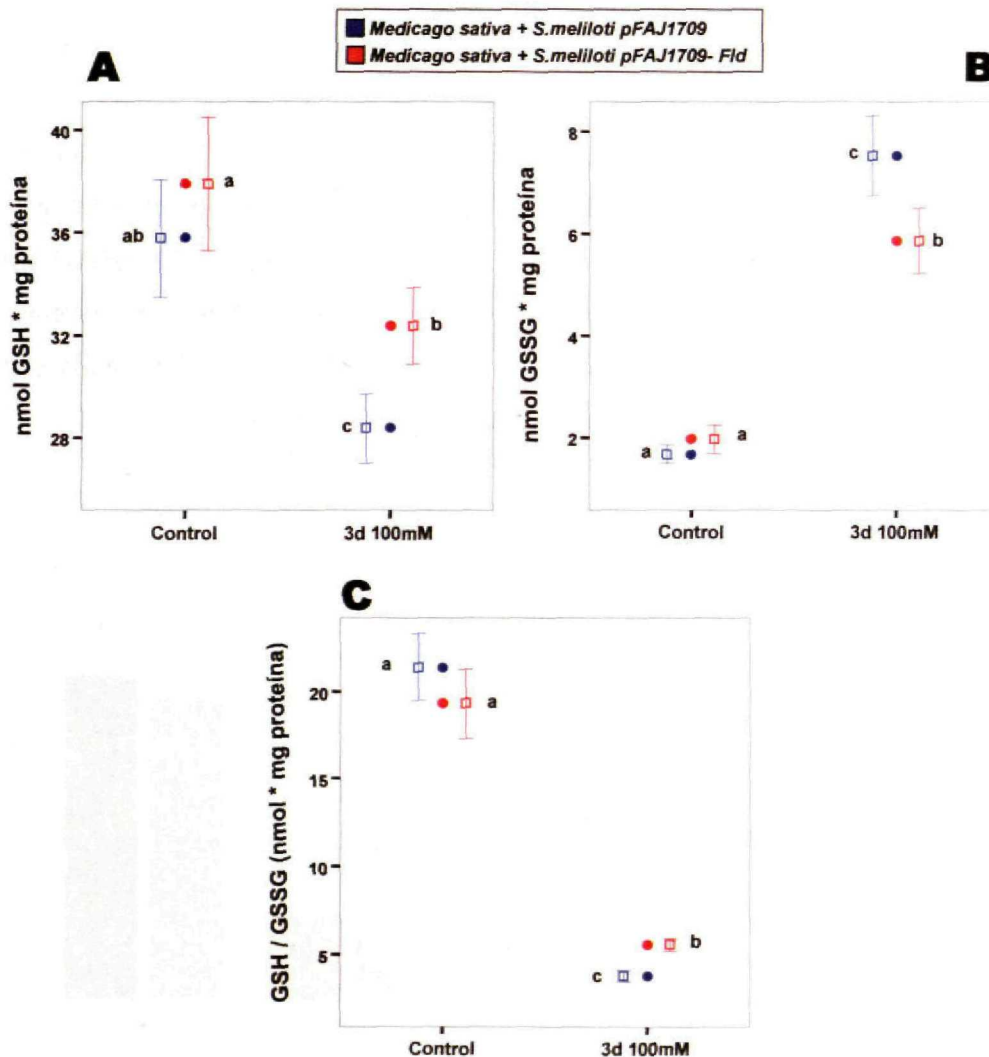


Figura 3.28. **Glutation.** Determinación del glutatión reducido y oxidado y cálculo del balance de glutatión (GSH/GSSG) en nódulos de plantas de *Medicago sativa* cv. Aragon-R1 inoculadas con *Sinorhizobium meliloti* 2011 (pFAJ1709 y pFAJ1709-Fld) y sometidas a estrés salino (18d + 3d 100 mM NaCl). (A) GSH, glutatión reducido; (B) GSSG, glutatión oxidado; (C) GSH/GSSG, balance redox del glutatión. La cantidad de glutatión se relativizó a mg de proteína. Los valores representan la media de 7 determinaciones y las barras de error la desviación típica de la media. Las diferencias significativas están representadas con diferentes letras ( $p \leq 0.05$ ; LSD).



En condiciones control, el balance redox del glutation fue similar en ambos tipos de nódulos (Figura 3.28C y Tabla 3.3). No obstante, según el balance de las determinaciones relativizadas a gramos de nódulo seco, los nódulos de las plantas inoculadas con *Sinorhizobium meliloti* pFAJ1709-Fld presentaron un balance significativamente más positivo. En los nódulos sometidos a estrés salino, los balances redox de glutation fueron significativamente superiores en los nódulos cuyos bacteroides expresan la flavodoxina.

#### 4.4. Metabolismo carbonado

Se estudiaron las actividades enzimáticas sacarosa sintasa y fosfoenolpiruvato carboxilasa representativas del metabolismo carbonado del nódulo, en nódulos de plantas de *Medicago sativa* inoculadas con *Sinorhizobium meliloti* 2011 (pFAJ1709 y pFAJ1709-Fld) y sometidas a estrés salino (18d + 3d 100 mM NaCl). Se expresó la actividad específica de SS y PEPc como nmoles de NADPH o NADH oxidado por minuto y mg de proteína respectivamente (Figura 3.29 y Tabla 3.3).

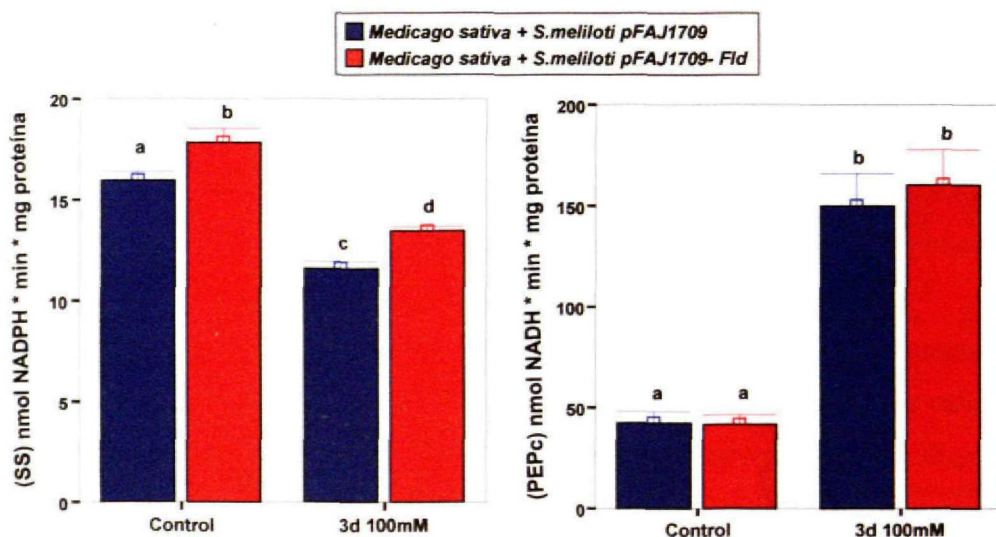


Figura 3.29. *Actividades sacarosa sintasa (SS) y fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPc)*. Determinación de las actividades SS y PEPc en nódulos de plantas de *Medicago sativa* cv. Aragon-R1 inoculadas con *Sinorhizobium meliloti* 2011 (pFAJ1709 y pFAJ1709-Fld) y sometidas a estrés salino (18d + 3d 100 mM NaCl). La actividad específica se expresó como  $\mu$ moles de NADPH ó NADH oxidado por minuto y relativizado a mg de proteína. Los valores representan la media y las barras de error la desviación típica de la media. Las diferencias significativas están representadas con diferentes letras ( $p \leq 0.05$ ; LSD).

La actividad SS fue mayor en los nódulos de las plantas inoculadas con *Sinorhizobium meliloti* pFAJ1709-Fld que en los nódulos control (pFAJ1709). Se observaron diferencias significativas en la actividad SS entre los diferentes nódulos tanto en la situación control (18d + 3d 0 mM NaCl) como en presencia del estrés salino (18d + 3d 100 mM NaCl). Se observó un descenso significativo en la actividad SS en presencia del estrés salino en ambos tipos de nódulos. No hubo diferencias significativas en la actividad PEPc de los diferentes nódulos. Se observó un incremento significativo en la actividad PEPc en presencia del estrés salino similar para ambos tipos de nódulos.

■ *Medicago sativa* + *S. meliloti* pFAJ1709  
 ■ *Medicago sativa* + *S. meliloti* pFAJ1709-Fld

	Control	Control	3d 100 mM	3d 100 mM
<b>SOD</b>				
Unids SOD mg <sup>-1</sup> proteína	164,89a	165,09a	144,69b	151,23b
Unids SOD g <sup>-1</sup> nódulo sec	9,87a	8,93a	6,68b	7,02b
<b>CAT</b>				
μmol min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> proteína	16,74a	15,40a	21,73b	21,07b
μmol min <sup>-1</sup> g <sup>-1</sup> nódulo sec	475,50a	474,22a	631,12b	619,17b
<b>APX</b>				
nmol min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> proteína	165,17a	173,61a	112,47c	135,62b
μmol min <sup>-1</sup> g <sup>-1</sup> nódulo sec	86,73a	91,71a	62,70c	70,54b
<b>MDHAR</b>				
nmol min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> proteína	4,88a	4,92a	3,50b	3,39b
μmol min <sup>-1</sup> g <sup>-1</sup> nódulo sec	42,41a	45,58a	31,84b	33,69b
<b>DHAR</b>				
μmol min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> proteína	174,68a	181,13a	98,77c	113,92b
μmol min <sup>-1</sup> g <sup>-1</sup> nódulo sec	6,96a	7,39a	3,68c	4,84b
<b>GR</b>				
nmol min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> proteína	18,06a	16,98a	11,92c	14,53b
μmol min <sup>-1</sup> g <sup>-1</sup> nódulo sec	64,44a	60,14a	45,89c	51,43b
<b>GSH</b>				
nmol mg <sup>-1</sup> proteína	35,77ab	37,91a	28,35c	32,34b
nmol g <sup>-1</sup> nódulo sec	176,45a	181,93a	125,31c	145,07b
<b>GSSG</b>				
nmol mg <sup>-1</sup> proteína	1,68a	1,98a	7,54c	5,88b
nmol g <sup>-1</sup> nódulo sec	7,64ab	6,39a	22,94c	18,41b
<b>GSH/GSSG</b>				
(mg <sup>-1</sup> proteína)	21,38a	19,30a	3,78c	5,53b
(g <sup>-1</sup> nódulo sec)	23,32b	28,83a	5,49c	7,94d



	Control	Control	3d 100 mM	3d 100 mM
SS				
nmol mg-1 proteína	16,01a	17,90b	11,61c	13,51d
PEPc				
nmol mg-1 proteína	42,38a	41,65a	149,53b	160,40b

Tabla 3.3. **Metabolismo oxidativo y carbonado.** Determinaciones de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos del metabolismo oxidativo y actividades enzimáticas del metabolismo carbonado en nódulo de plantas de *Medicago sativa* cv. Aragon-R1 inoculadas con *Sinorhizobium meliloti* 2011 (pFAJ1709 y pFAJ1709-Fld) y sometidas a estrés salino (18d + 3d 100mM NaCl). SOD, superóxido dismutasa; CAT, catalasa; APX, ascorbato peroxidasa; MDHAR, monodehidroascorbato peroxidasa; DHAR, dehidroascorbato peroxidasa; GR, glutatión reductasa; GSH, glutatión reducido; GSSG, glutatión oxidado; GSH/GSSG, balance redox del glutatión. Los valores representan la media. Las diferencias significativas están representadas con diferentes letras ( $p \leq 0.05$ ; LSD).

4.5. Alteraciones estructurales y ultraestructurales

Se estudiaron las características estructurales y ultraestructurales de los nódulos de plantas de *Medicago sativa* inoculadas con *Sinorhizobium meliloti* 2011 control (wt ó pFAJ1709) ó pFAJ1709-Fld, crecidas en condiciones control (18d + 3d 0 mM NaCl) o sometidas a estrés salino (18d + 3d 100 mM NaCl). Se analizaron secciones de nódulos mediante microscopía óptica y microscopía electrónica de transmisión.

El estudio de los nódulos crecidos en condiciones control se detalló anteriormente en nódulos de 10, 30 y 44 dpi (Resultados 3.4). Los nódulos de 21 dpi crecidos en condiciones control eran efectivos y presentaban una  $Z_{III}$  desarrollada. Aparentemente no se observaron diferencias significativas a lo largo de la sección de los nódulos de las plantas inoculadas con las bacterias que expresan la flavodoxina, con respecto al desarrollo y a la estructura típica de los nódulos control. No obstante, la mayor acumulación de almidón en las células infectadas y no infectadas observada en los nódulos de 30 y 44 dpi (Resultados 3.4), comenzó ya a ser constatable en los nódulos de 21 dpi, fundamentalmente en la  $Z_{III}$  distal, y en la zona más basal (datos no mostrados).

Los nódulos de las plantas inoculadas con las bacterias control (wt ó pFAJ1709) y sometidas al estrés salino presentaron importantes alteraciones en la estructura y organización longitudinal del nódulo, así como variaciones en la morfología de las células (Figura 3.30A), con respecto a los nódulos de 21 dpi del tratamiento control.

En general, se observaron células muy irregulares con aparente pérdida de turgencia, fundamentalmente en la  $Z_{II}$  (Figuras 3.30B, C) y en células no invadidas de la  $Z_{III}$  (Figuras 3.30D, E). Aparentemente, no se observan alteraciones significativas en la zona de unión a la raíz ni en los haces vasculares (Figura 3.30F).

En la zona de infección ( $Z_{II}$  distal), no se observó la típica disposición bacteriana dentro de las células recién infectadas. Las células invadidas contenían gran cantidad de bacteroides formando cúmulos (Figura 3.30B). En general, se observaron grandes alteraciones en los bacteroides, no obstante algunos presentaron el patrón de diferenciación más o menos típico (Figura 3.31A-C). Las células infectadas de la  $Z_{II}$  presentaban numerosas vesículas (Figura 3.31B). Aunque se distinguieron bacteroides de tipo I y II (Figura 3.31B, C) en la  $Z_{II}$ , y bacteroides de tipo III (Figura 3.31D) en la  $Z_{II-III}$ , la mayoría de los bacteroides estaban muy alterados. Se observaron bacteroides con espacios peribacteroidales muy pronunciados y citoplasmas heterogéneos con estructuras tipo vesícula, a menudo próximas a la membrana del bacteroide (Figura 3.31C-E). Las células invadidas de la  $Z_{II}$  proximal presentaban muy pocos bacteroides (Figura 3.30C). En las células infectadas de la  $Z_{II-III}$ , se observó una menor acumulación de almidón (Figura 3.30C y 3.31D, E).

En la zona de fijación ( $Z_{III}$ ), los bacteroides de las células invadidas presentaban diferentes grados de degeneración o deterioro. En general, las células infectadas de la  $Z_{III}$  distal presentaban bacteroides aparentemente más deteriorados, a menudo formando cúmulos indistinguibles (Figuras 3.30D y 3.31F), que los bacteroides de las células infectadas de la  $Z_{III}$  basal (Figuras 3.30E y 3.31G, H). Se observó una gran vacuolización de las células. Las vacuolas no presentaban la ubicación central típica ya que se disponían entre los bacteroides (Figuras 3.30D, E). Los bacteroides presentaron básicamente las mismas alteraciones descritas en la  $Z_{II}$ . No obstante, en la  $Z_{III}$  distal, se observaron células infectadas con bacteroides completamente deteriorados junto a multitud de vesículas citoplásmicas (Figura 3.31F). Por su parte, los bacteroides de la parte más basal (tipo IV), aunque con importantes alteraciones, presentan un menor grado de deterioro que en la  $Z_{III}$  distal (Figura 3.31G, H). En los bacteroides, la presencia de citoplasmas heterogéneos con estructuras vesiculares podría confundirse con la acumulación de gránulos de polihidroxibutirato. No obstante, la continuidad de las vesículas, su posicionamiento más o menos periférico y la escasa densidad a los electrones parecen indicar que se trata de vesículas o disgregaciones del contenido del bacteroide (detalle en Figura 3.31G). Aparentemente, los orgánulos no seguían el patrón



de organización típico, y en el caso de las mitocondrias encontramos formas alargadas (Figura 3.31E).

El tratamiento salino parece haber afectado en menor grado a los nódulos de las plantas inoculadas con *Sinorhizobium meliloti* 2011 pFAJ1709-Fld. Sin embargo, algunas de las alteraciones estructurales o de las variaciones morfológicas anteriormente descritas fueron observadas, aunque en general, en mucha menor medida (Figura 3.32). La morfología de las células de las diferentes zonas fue mucho más regular y prácticamente no hubo diferencias significativas con respecto a los nódulos crecidos en condiciones control (Figura 3.32). Se observó una estructura y organización del meristemo aparentemente menos alterada que la de los nódulos control sometidos a estrés salino (Figura 3.32A). En las células invadidas de la Z<sub>II</sub> distal se observaron bacteroides ocupando posiciones más o menos periféricas (Figura 3.32B y 3.33B). En general, los bacteroides estaban poco alterados. En la Z<sub>II</sub>, se distinguieron bacteroides de tipo I y II (Figura 3.33A, B) y bacteroides de tipo III en la Z<sub>II-III</sub> (Figura 3.33C). En la Z<sub>II-III</sub>, las células infectadas presentaban más amiloplastos que los nódulos control (Figuras 3.32B y 3.33C). No obstante, se observó una menor cantidad de amiloplastos con respecto a los nódulos crecidos en condiciones control (datos no mostrados).

Mediante microscopia óptica, aparentemente no se observaron grandes alteraciones en la integridad de los bacteroides de la Z<sub>III</sub> tanto en su zona más distal (Figura 3.32D) como en su parte más basal (Figura 3.32E). Esto fue confirmado en el estudio mediante microscopía electrónica. Junto a bacteroides maduros de tipo IV poco alterados se observaron otros bacteroides menos diferenciados que presentaban las alteraciones anteriormente descritas (vesículas y amplio espacio peribacteroidal) (Figura 3.33E, F). No hubo diferencias significativas en el grado de alteración o deterioro entre los bacteroides localizados en la parte distal y proximal de la Z<sub>III</sub> (Figura 3.33D, F). La acumulación de gránulos de almidón a lo largo de la Z<sub>III</sub>, observada en los nódulos cuyos bacteroides expresan flavodoxina, crecidos en condiciones control (datos no mostrados) se hizo más evidente en los nódulos sometidos a estrés salino (Figuras 3.32D, E y 3.33D-H). Además, y a diferencia de los nódulos crecidos en condiciones control, se observó una destacable presencia de amiloplastos en las células infectadas próximas a la corteza lateral de la Z<sub>III</sub> y una gran acumulación de gránulos de almidón en las células corticales contiguas (Figura 3.32C). Del mismo modo, se observó una importante acumulación de gránulos de almidón en las células de la corteza próximas a los haces vasculares y en las propias células de transferencia de los haces vasculares

(Figura 3.32F). Aparentemente en estos nódulos no se observó la desubicación central de las vacuolas ni la masiva presencia de vesículas, descrita en los nódulos control. Se observaron mitocondrias con formas alargadas (Figura 3.33C).

Por otra parte, se realizó un estudio complementario mediante microscopía electrónica de barrido a baja temperatura, de las alteraciones estructurales producidas en los nódulos por el estrés salino.

Al igual que se describió en los estudios mediante microscopía óptica y microscopía electrónica de transmisión en los nódulos de plantas crecidas en condiciones control (21 dpi) aparentemente no se observaron diferencias significativas entre los tipos de nódulos, excepto una mayor presencia de amiloplastos y gránulos de almidón, fundamentalmente en la  $Z_{III}$  distal de los nódulos que incluyen los bacteroides que expresan la flavodoxina (Figura 3.34E). En las microfotografías, se puede observar la sección longitudinal del criocorte de un nódulo (Figura 3.34A), células de la  $Z_I$  (Figura 3.34B), células de la  $Z_{II}$  con bacteroides recién liberados (Figura 3.34C), células intersticiales con abundantes amiloplastos y células infectadas con bacteroides maduros en la zona de fijación, e incluso detalles de la estructura del canal de infección (Figura 3.34D-E).

En los nódulos control de plantas sometidas al estrés salino, se observaron importantes alteraciones en los bacteroides maduros de las células infectadas (Figura 3.35A-C). Se observaron células con bacteroides que presentaban una estructura menos degradada (Figura 3.35A) con respecto a otras células senescentes en las que fue imposible distinguir bacteroides y orgánulos (Figura 3.35C). En los bacteroides que expresan la flavodoxina, el deterioro de la estructura fue mucho menor (Figura 3.35D). No obstante, también se observaron células con bacteroides alterados ultraestructuralmente (Figura 3.35E). A diferencia de los nódulos control, no se encontraron células completamente colapsadas. Además, se comprobó de nuevo un aumento en la presencia de amiloplastos y gránulos de almidón con respecto a los mismos nódulos crecidos en condiciones control, fundamentalmente en las células intersticiales (Figura 3.35D-F).



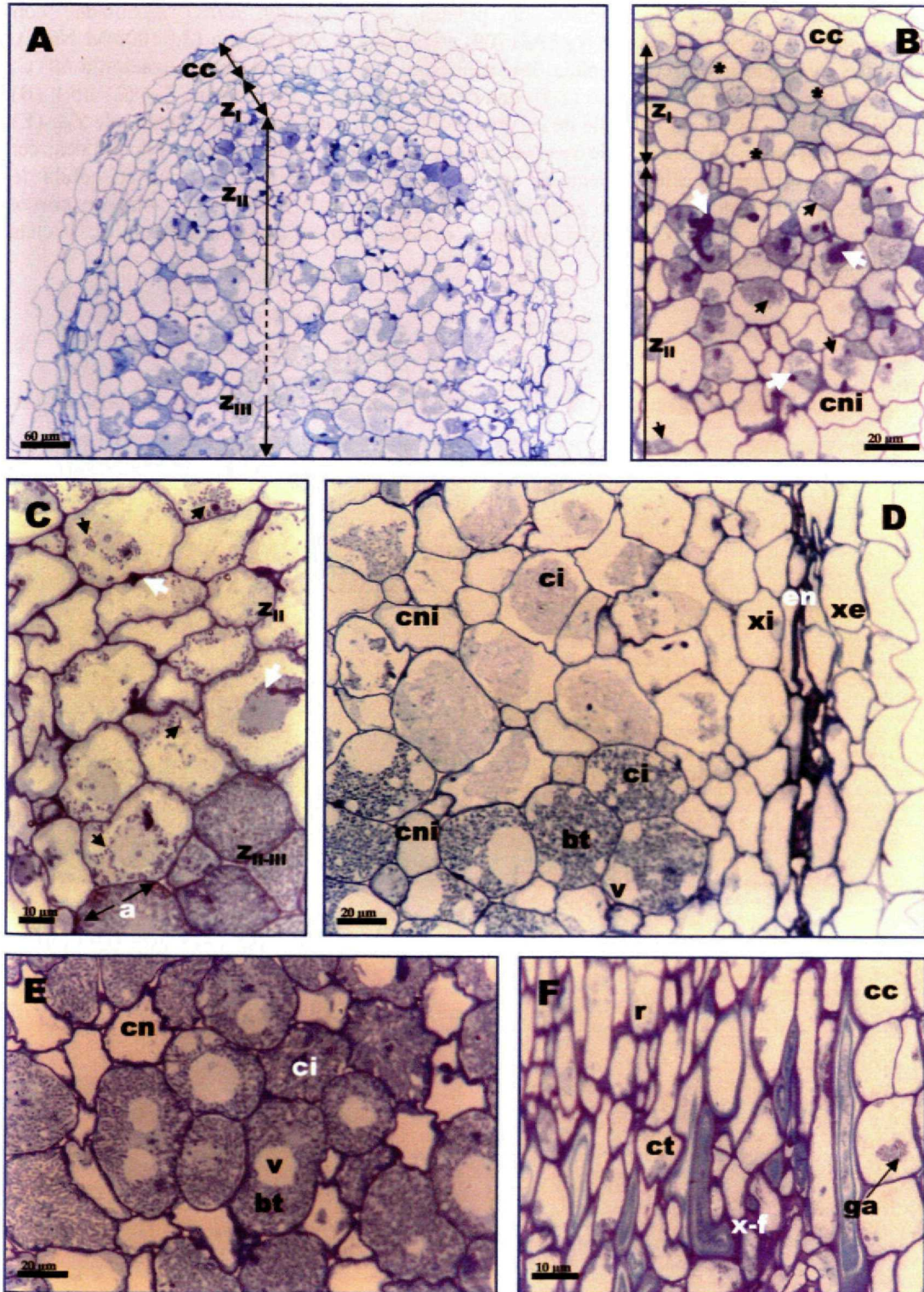
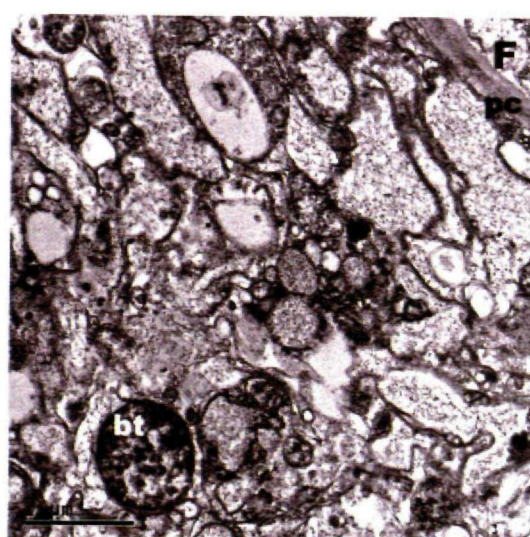
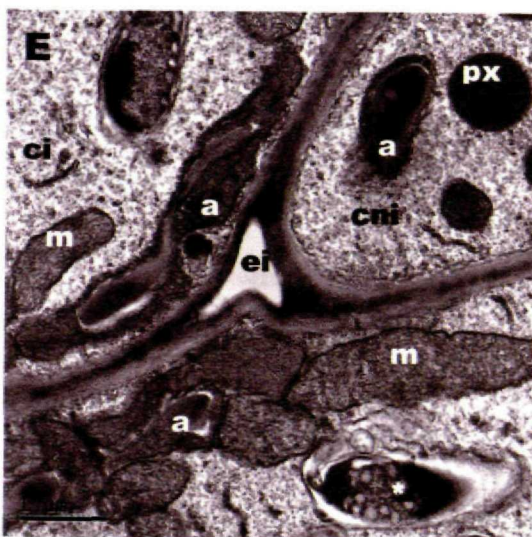
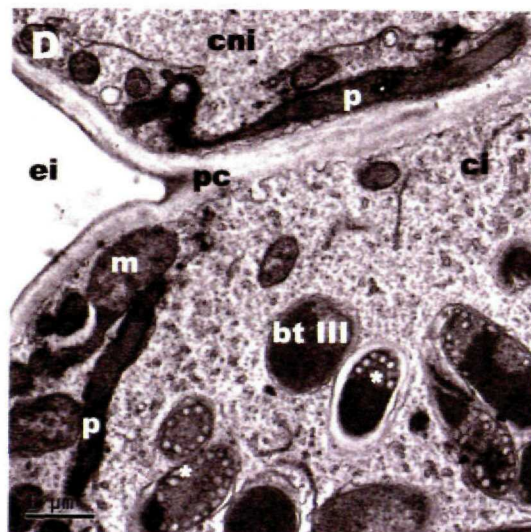
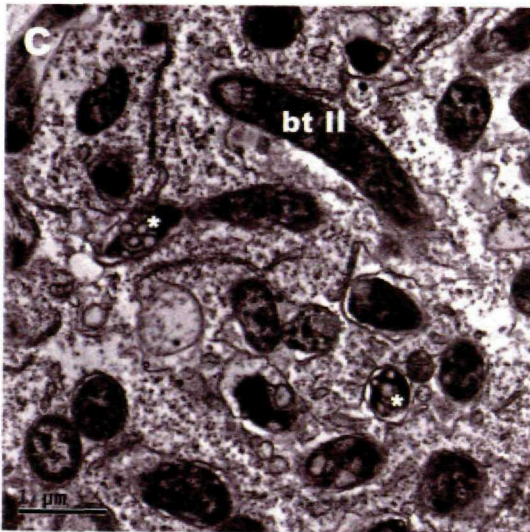
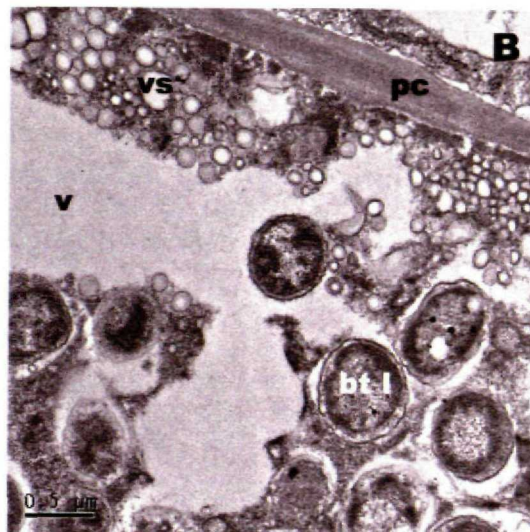


Figura 3.30. **Microfotografías ópticas de la estructura de los nódulos control sometidos a estrés salino.** Secciones de nódulos de plantas de *Medicago sativa* inoculadas con *Sinorhizobium meliloti* control (wt ó pFAJ1709) sometidas a estrés salino (3d 100mM NaCl), estudiadas mediante microscopía óptica. Inclusiones en LR-White con polimerización a 60° C. (A) Zona apical: Corteza, meristemo ( $Z_I$ ), zona de invasión ( $Z_{II}$ ) y de fijación ( $Z_{III}$ ) (21 dpi); (B) Detalle de  $Z_I$  y  $Z_{II}$  distal; (C) Detalle de  $Z_{II}$  proximal e interzona ( $Z_{II-III}$ ); (D) Detalle de  $Z_{III}$ ; (E) Detalle de  $Z_{III}$  basal; (F) Detalle de vaso. a: amiloplasto; bt o flechas negras: bacteroides; cc: célula de la corteza; ci: célula infectada; cni: célula no infectada o intersticial; ct: célula de transferencia; en: endodermis; ga: gránulo de almidón en a; r: raíz; v: vacuola; xi: cortex interno; xe: cortex externo; x-f: xilema-floema; estrellas negras: divisiones celulares; flechas blancas: canales de infección.







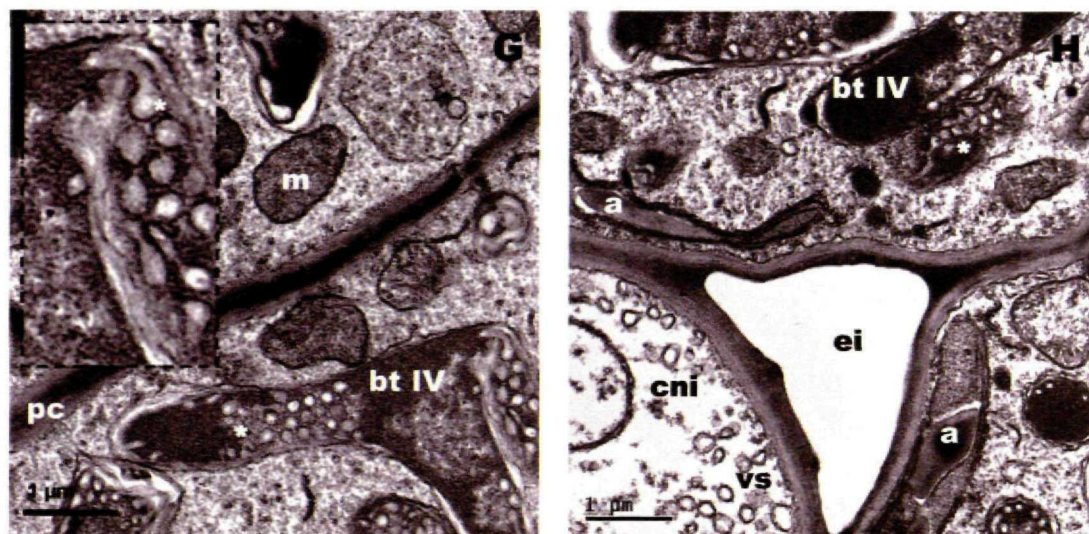


Figura 3.31. *Microfotografías electrónicas de la ultraestructura de los nódulos control sometidos a estrés salino.* Secciones de nódulos de plantas de *Medicago sativa* inoculadas con *Sinorhizobium meliloti* control (wt ó pFAJ1709) sometidas a estrés salino (3d 100mM NaCl), estudiadas mediante microscopía electrónica de transmisión. Inclusiones en LR-White con polimerización a 60° C. (A) Canal de infección; (B) Bacteroides y vesículas en zona de invasión ( $Z_{II}$ ); (C) Bacteroides en  $Z_{II}$  proximal; (D) Bacteroides en interzona ( $Z_{II-III}$ ); (E) Detalle de células en  $Z_{II-III}$ ; (F) Célula senescente en la zona distal de fijación ( $Z_{III}$ ); (G) Bacteroides en  $Z_{III}$  basal y detalle de vesículas; (H) Detalle de células en  $Z_{III}$  basal. a: amiloplasto; ba: bacterias; bt: bacteroides: bt I-IV: tipos de bacteroides; ci: célula infectada; cni: célula no infectada o intersticial; ei: espacio intercelular; if: canales de infección; m: mitocondria; p: plastidio; pc: pared celular; px: peroxisoma; v: vacuola; vs: vesícula citoplásmica; estrellas blancas: vesículas.



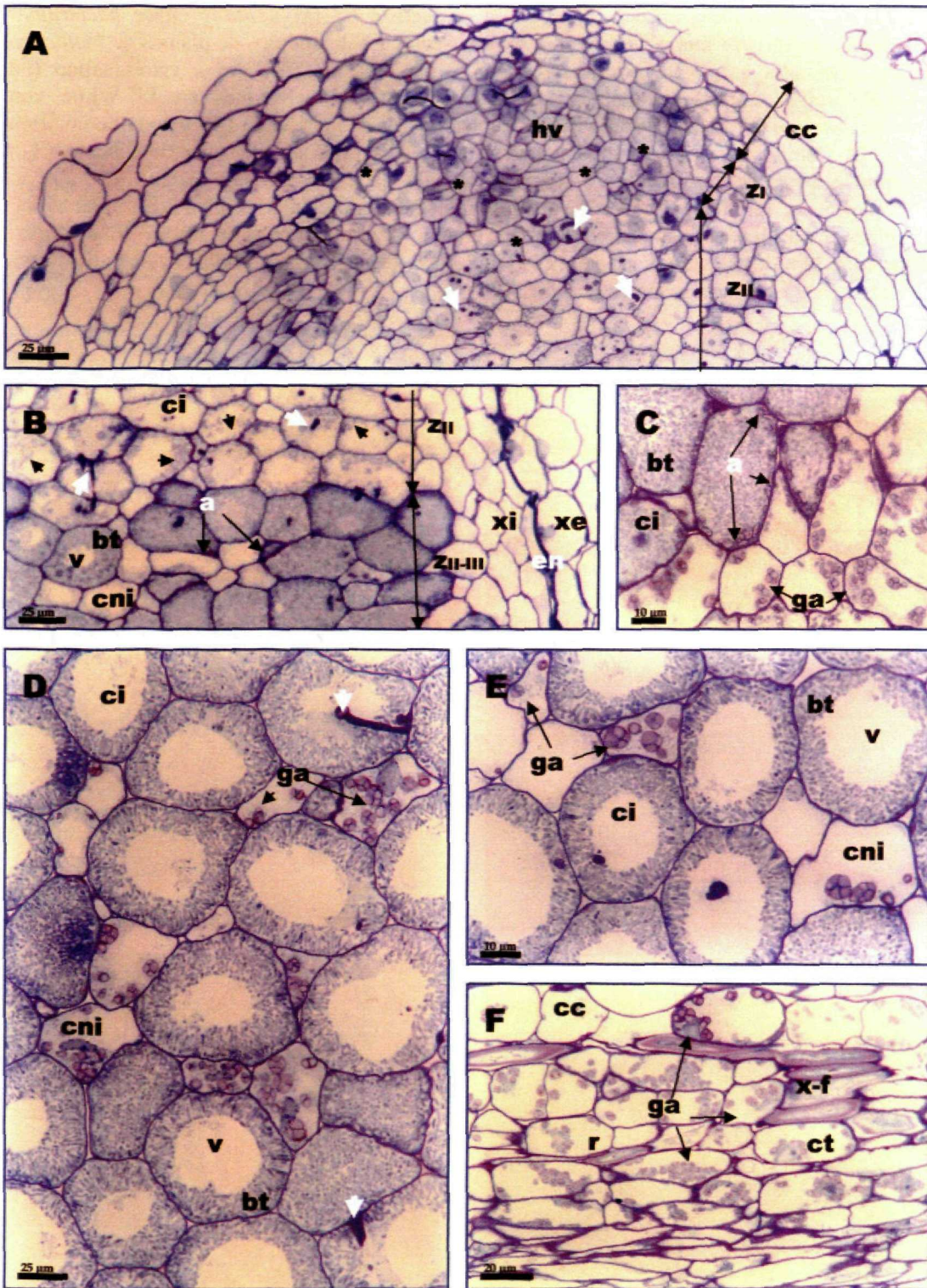
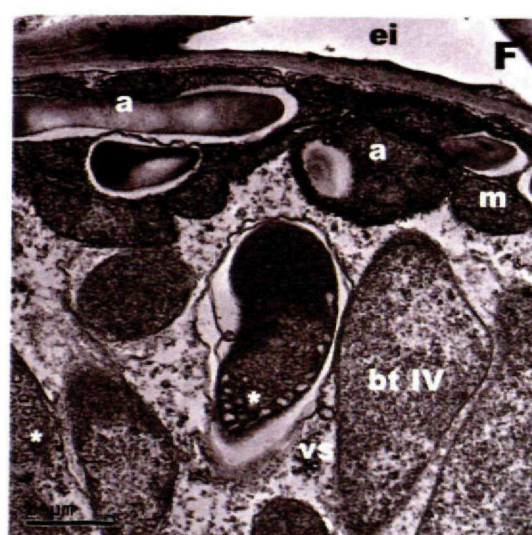
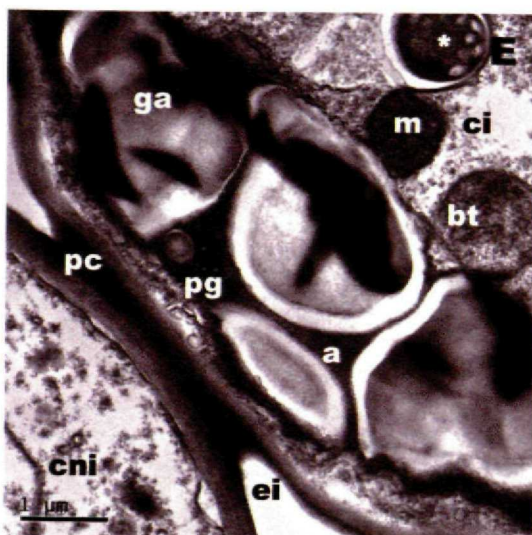
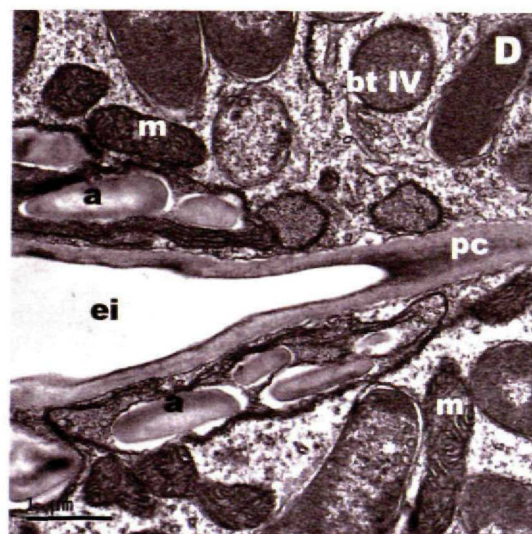
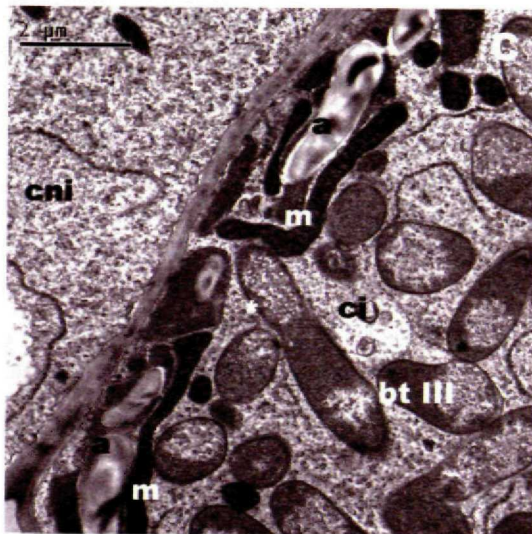
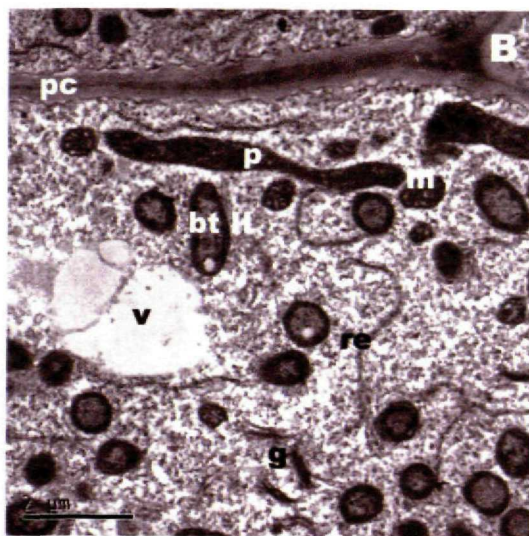
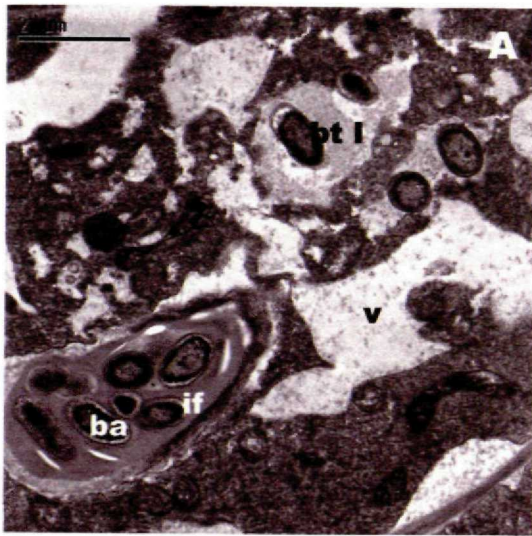


Figura 3.32. **Microfotografías ópticas de la estructura de los nódulos cuyos bacteroides expresan flavodoxina sometidos a estrés salino.** Secciones de nódulos de plantas de *Medicago sativa* inoculadas con *Sinorhizobium meliloti* pFAJ1709-Fld sometidas a estrés salino (3d 100mM NaCl), estudiadas mediante microscopía óptica. Inclusiones en LR-White con polimerización a 60° C. (A) Detalle de zona apical: Corteza, meristemo ( $Z_I$ ) y zona de invasión ( $Z_{II}$ ); (B) Detalle de  $Z_{II}$  proximal e interzona ( $Z_{II-III}$ ); (C) Detalle de zona de fijación ( $Z_{III}$ ) próxima a corteza; (D) Detalle de  $Z_{III}$ ; (E) Detalle de  $Z_{III}$  basal; (F) Detalle de vaso. a: amiloplasto; cc: célula de la corteza; ci: célula infectada; cni: célula no infectada o intersticial; ct: célula de transferencia; en: endodermis; ga: gránulo de almidón en a; hv: haz vascular; r: raíz; v: vacuola; xe: cortex externo; xi: cortex interno; x-f: xilema-floema; estrellas negras: divisiones celulares; flechas blancas: canales de infección.







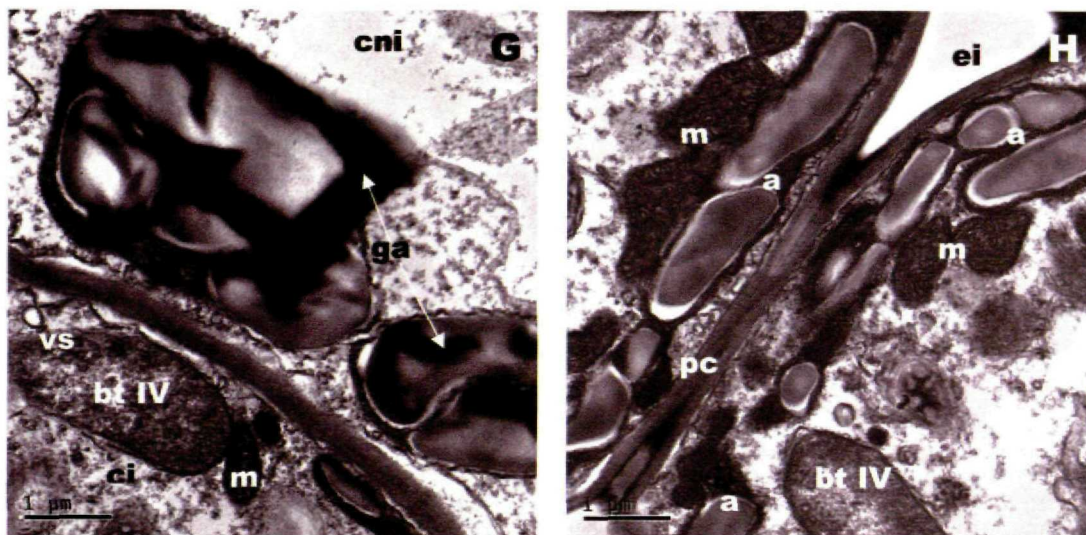


Figura 3.33. *Microfotografías electrónicas de la ultraestructura de los nódulos cuyos bacteroides expresan flavodoxina sometidos a estrés salino*. Secciones de nódulos de plantas de *Medicago sativa* inoculadas con *Sinorhizobium meliloti* pFAJ1709-Fld sometidas a estrés salino (3d 100mM NaCl), estudiadas mediante microscopía electrónica de transmisión. Inclusiones en LR-White con polimerización a 60° C. (A) Canal de infección; (B) Bacteroides en la parte proximal de la zona de invasión ( $Z_{II}$ ); (C) Bacteroides en interzona ( $Z_{II-III}$ ); (D-E) Células infectadas en la zona distal de fijación ( $Z_{III}$ ); (F) Bacteroides en  $Z_{III}$  basal; (G) Células en  $Z_{III}$  basal; (H) Célula infectada en  $Z_{III}$  basal. a: amiloplasto; ba: bacterias; bt: bacteroides: bt I-IV: tipos de bacteroides; ci: célula infectada; cni: célula no infectada o intersticial; ei: espacio intercelular; g: aparato de Golgi; ga: gránulo de almidón en a; if: canales de infección; m: mitocondria; p: plastidio; pc: pared celular; pg: plastoglóbulos; re: retículo; v: vacuola; vs: vesícula citoplásmica; estrellas blancas: vesículas.



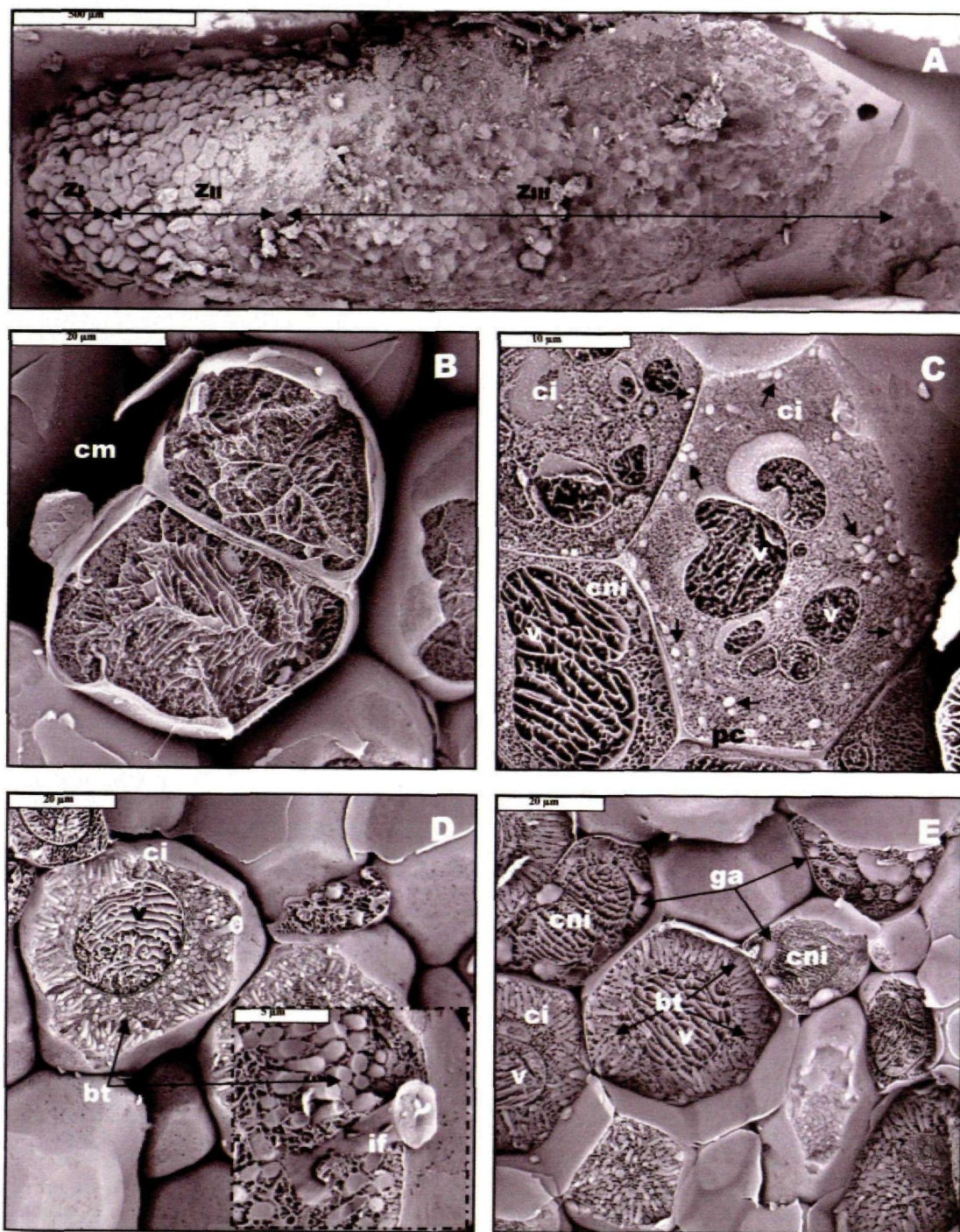


Figura 3.34. **Microfotografías electrónicas de la ultraestructura de nódulos.** Estudio mediante microscopía electrónica de barrido a baja temperatura de la estructura de nódulos de plantas de *Medicago sativa* inoculadas con *Sinorhizobium meliloti* control (wt y pFAJ1709) (A-D) y pFAJ1709-Fld (E) en condiciones control (21 dpi). (A) Sección longitudinal del criocorte del nódulo; (B) Detalle de la zona meristémica (Z<sub>I</sub>); (C) Detalle de la zona de invasión (Z<sub>II</sub>); (D) Detalle de canal de infección; (E) Detalle de la zona de fijación (Z<sub>III</sub>). bt o flechas negras: bacteroides; ci: célula infectada; cni: célula no infectada o intersticial; cm: célula meristémica; ga: gránulo de almidón; if: canal de infección; pc: pared celular; v: vacuola.



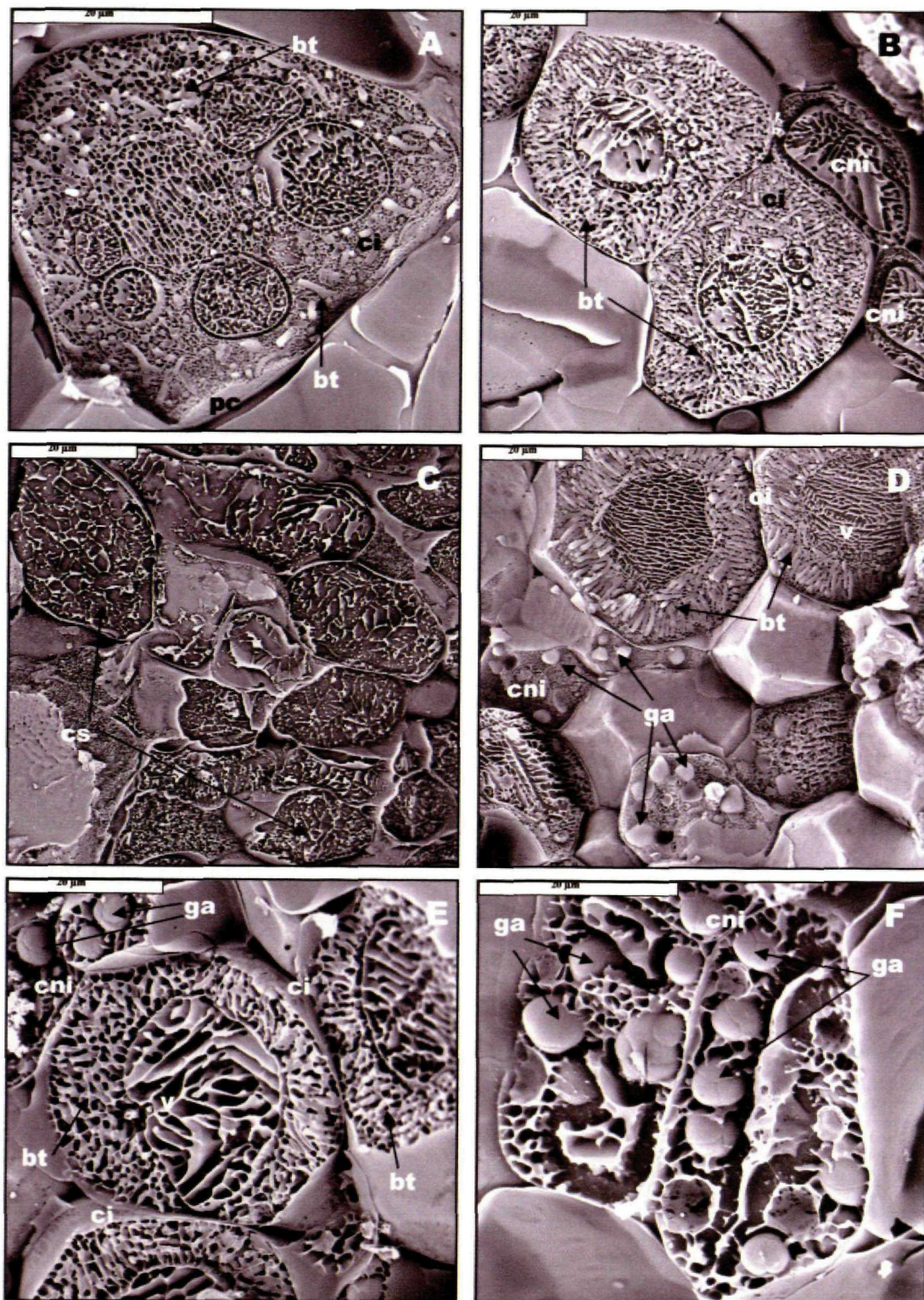


Figura 3.35. **Microfotografías electrónicas de la ultraestructura de nódulos sometidos a estrés salino.** Estudio mediante microscopia electrónica de barrido a baja temperatura de la estructura de nódulos de plantas de *Medicago sativa* inoculadas con *Sinorhizobium meliloti* control (wt y pFAJ1709) (A-C) y pFAJ1709-Fld (D-F) sometidas a estrés salino (21dpi, 3d 100mM NaCl). (A-B) Detalles de la zona de fijación ( $Z_{III}$ ); (C) Detalle zona basal ( $Z_{III}$  proximal); (D) Detalle zona de fijación ( $Z_{III}$  distal); (E) Detalle zona basal ( $Z_{III}$  proximal); (F) Detalle de célula intersticial. bt: bacteroides; ci: célula infectada; cni: célula no infectada o intersticial; cs: célula senescente; ga: gránulo de almidón; pc: pared celular; v: vacuola.



## 5. Expresión de la proteína flavodoxina de *Anabaena variabilis* en plantas de *Medicago truncatula*

### 5.1. Transformación y selección de líneas transgénicas

Se transformaron plantas de *Medicago truncatula* (Gaertn.) línea R-108 (c3) con el gen *fld* de la cianobacteria *Anabaena variabilis* PCC 7119 que codifica para la proteína flavodoxina, mediante infección por *Agrobacterium tumefaciens*. Después del co-cultivo de explantes de hojas de *Medicago truncatula* con *Agrobacterium tumefaciens* se eliminó la bacteria y se realizó el cultivo *in vitro* de los explantes. Las células transformadas se dividieron y crecieron formando callos embriogénicos y estos se disgregaron para favorecer el desarrollo de los embriones. Se regeneraron plántulas completas con un par de trifolios, tallo y sistema radicular a partir de los embriones somáticos.

Las plántulas transformadas y regeneradas, generación  $T_0$ , crecieron en maceta en cámara de cultivo bajo condiciones controladas para la producción de semillas por autopolinización. Las semillas se sembraron para dar lugar a plantas de la generación  $T_1$ . Las plantas  $T_1$  se identificaron y crecieron independientemente en macetas durante 2 semanas aproximadamente. Se realizó un ensayo GUS para eliminar posibles escapes y reducir el número de líneas de estudio (Figura 3.36). No se detectó actividad GUS en aproximadamente un 25% de las plantas  $T_1$  analizadas (*Medicago truncatula* R108-1  $Km^R Bar^R Gus^-$ ). Las plantas  $T_1 Gus^+$  crecieron en macetas independientes en cámara de cultivo bajo condiciones controladas. Periódicamente se recogió material vegetal (hojas y tallos jóvenes) y se mantuvieron para la producción de semillas por autopolinización para obtener la generación  $T_2$ .

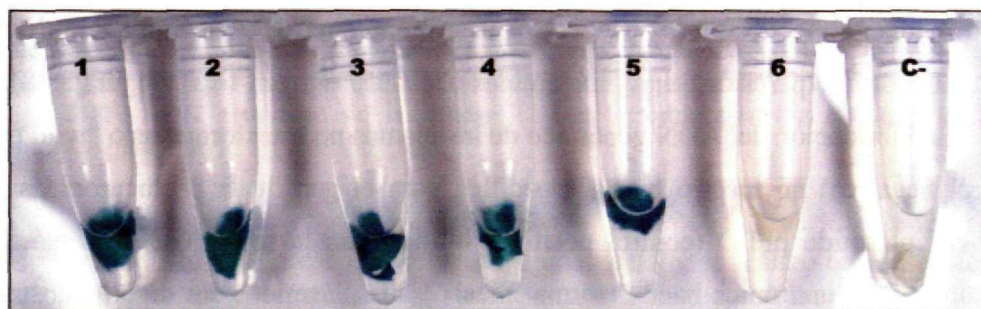


Figura 3.36. **Detección histológica de la actividad  $\beta$ -glucuronidasa (Gus) en líneas transgénicas.** Ensayo GUS en hojas de *Medicago truncatula* R-108-1. Precipitado azul en las hojas con expresión Gus. (1-5) plantas  $T_1$ - $Gus^+$ ; (6) planta  $T_1$ - $Gus^-$ ; (C-) plantas control  $Gus^-$ .

Se aisló y purificó el ADN genómico de las hojas recogidas procedentes de las líneas preseleccionadas  $T_1$   $Gus^+$  y se utilizó para estudiar la inserción del T-ADN mediante *southern blot*. El ADN genómico se digirió con la enzima *Xba* I, que corta una sola vez en la zona del T-ADN, para la obtención de bandas de distinto tamaño en función del lugar de inserción del T-ADN y la distancia a la que se encuentra en el ADN genómico la siguiente diana para la enzima *Xba* I (Figura 3.37).

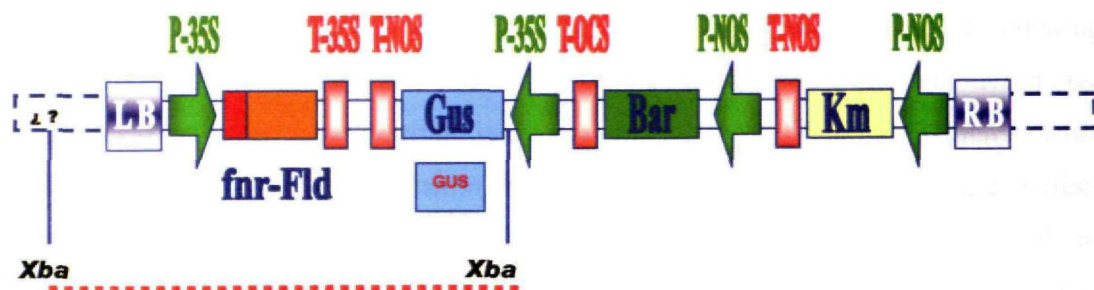


Figura 3.37. **Esquema del T-ADN.** Región del ADN de pFLD insertada en el genoma de *Medicago truncatula*. Se muestran los sitios de corte conocidos y esperados para *Xba* I y la situación de la sonda GUS. RB y LB, secuencias señal de inserción; Km, resistencia a kanamicina bajo el control del promotor y terminador de la nopalina sintetasa (NOS); Bar, resistencia al herbicida BASTA bajo el control del promotor de la NOS y el terminador de la octopina sintetasa (OCS); Gus, gen marcador de la  $\beta$ -glucuronidasa bajo el control del promotor del 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) y el terminador de la NOS; fnr-Fld, gen de la flavodoxina fusionado al péptido tránsito de la ferredoxina  $NADP^+$  oxidoreductasa (FNR) y bajo el control del promotor y terminador del 35S de CaMV.

Se analizaron 14 líneas previamente seleccionadas  $T_1$   $Gus^+$ . Inicialmente se utilizó una sonda FLD de 502 pares de bases (nucleótidos 20-521 del gen *Fld*) para la hibridación con el ADN genómico. No se detectó hibridación con el ADN genómico de las líneas preseleccionadas  $T_1$   $Gus^+$  (datos no mostrados) por lo que se utilizó la sonda GUS para analizar la inserción del T-ADN. El ADN genómico digerido con *Xba* I se separó mediante electroforesis y se transfirió a membrana para su hibridación con la sonda GUS de 727 pares de bases (nucleótidos 631-1357 del gen *Gus*) (Figura 3.38).

La hibridación del ADN genómico de las plantas no transformadas o “wild type” (control negativo) no mostró banda específica para el gen de la  $\beta$ -glucuronidasa. El ADN del plásmido pFLD (control positivo) hibridó con la sonda GUS. El plásmido digerido mostró una única banda (forma lineal) y los plásmidos sin digerir mostraron dos bandas (formas súper enrolladas). Las condiciones de hibridación del *southern blot* son válidas para estudiar la inserción del T-ADN en las plantas transformadas.



La hibridación del ADN genómico procedente de las líneas 3, 9, 10, 22, 27, 43, 65, 70, 82, 83, 85 y probablemente la línea 81, mostró una única banda de igual tamaño. Todas ellas proceden de un mismo evento de transformación (Fld-1) y presentan una única inserción del T-ADN. Según la intensidad de las bandas, las líneas 3, 9, 10, 22, 43, 65 y 85 son aparentemente homocigotas mientras que las líneas 27, 70, (81), 82 y 83 son aparentemente heterocigotas. El ADN genómico procedente de la línea 80 no mostró hibridación con la sonda GUS. La hibridación del ADN genómico procedente de la línea 50 mostró una única banda débil y de diferente tamaño con respecto al evento de transformación anteriormente descrito. Se trata de un segundo evento de transformación (Fld-2) y según la intensidad de la banda, probablemente se trate de una línea heterocigota.

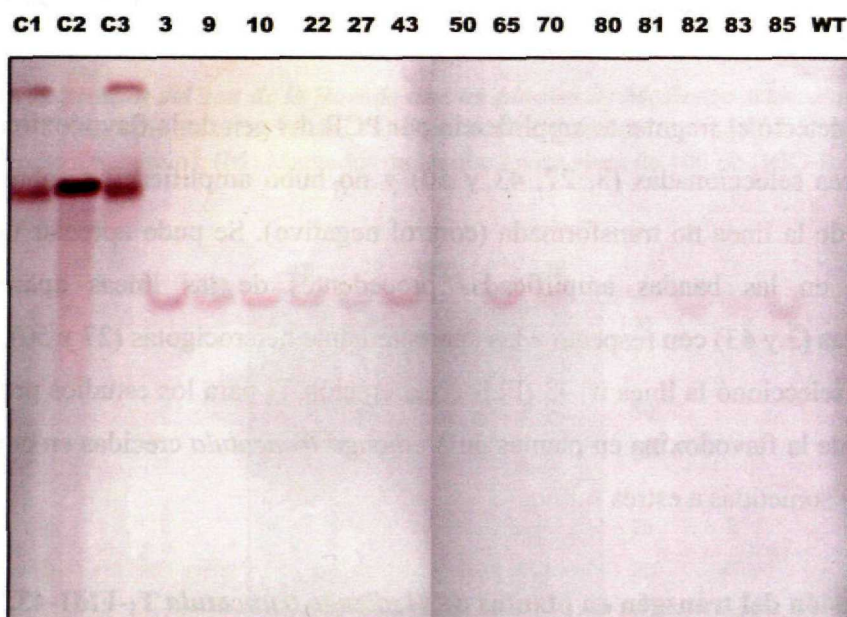


Figura 3.38. **Análisis de la inserción del T-ADN en el ADN genómico de plantas de *Medicago truncatula* mediante southern blot.** Hibridación del ADN genómico, digerido con *Xba* I, separado electroforéticamente y transferido a membrana, con la sonda GUS (727 pb) marcada con digoxigenina. C1 y C3 control positivo pFLD (5 y 10 ng); C2 control positivo pFLD / *Xba* I (15 ng); 3-85, ADN genómico de las líneas T1-Gus<sup>+</sup> preseleccionadas (10 µg); wt, ADN genómico de planta no transformada (10 µg).

Para confirmar la presencia del transgén de estudio, se realizó una amplificación por PCR del gen *Fld* sobre el ADN genómico de las líneas seleccionadas a partir de los resultados del *southern blot*. Se seleccionaron las líneas 3 y 43 (aparentemente

homocigotas) y 27 (aparentemente heterocigota) del evento Fld-1 y la línea 50 (aparentemente heterocigota) del evento Fld-2 (Figura 3.39).



Figura 3.39. **Presencia del gen de la flavodoxina en el ADN genómico de plantas de *Medicago truncatula* mediante amplificación por PCR.** (WT) línea no transformada; (27) línea heterocigota del evento Fld-1; (3 y 43) líneas homocigotas del evento Fld-1; (50) línea heterocigota del evento Fld-2; (M) Marcador molecular pBR322 / *Msp* I (New England Biolabs).

Se detectó el fragmento amplificado por PCR del gen de la flavodoxina (502 pb) en las líneas seleccionadas (3, 27, 43 y 50) y no hubo amplificación sobre el ADN genómico de la línea no transformada (control negativo). Se pudo apreciar una mayor intensidad en las bandas amplificadas procedentes de las líneas aparentemente homocigotas (3 y 43) con respecto a las aparentemente heterocigotas (27 y 50).

Se seleccionó la línea n° 43 (Fld-1) generación T<sub>2</sub> para los estudios preliminares del efecto de la flavodoxina en plantas de *Medicago truncatula* crecidas en condiciones normales y sometidas a estrés salino.

## 5.2. Expresión del transgén en plantas de *Medicago truncatula* T<sub>1</sub>-Fld1-43.

Para confirmar la expresión del transgén en la línea seleccionada n° 43, se llevaron a cabo estudios de RT-PCR y *western blot* (niveles postranscripcional y postraducciona).

En la RT-PCR, el ARN total aislado y purificado de las hojas recogidas, se transcribió para la obtención del ADNc que fue utilizado como molde para la amplificación por PCR del gen de la flavodoxina (502 pb) (Figura 3.40). Se detectó el fragmento amplificado por PCR del gen la flavodoxina (502 pb) en la línea seleccionada n° 43. No hubo amplificación en el control negativo de la RT-PCR (ausencia de molde) ni sobre el ADNc procedente de la línea no transformada o silvestre. La amplificación



de *fld* sobre el ADNc indica la presencia de niveles de ARNm del gen de la flavodoxina en las plantas de *Medicago truncatula* T<sub>1</sub>-Fld1-43.

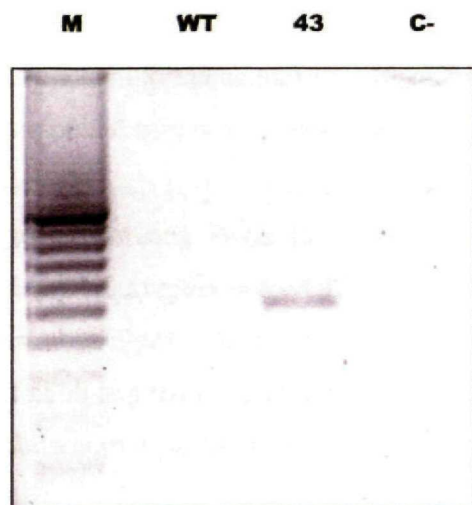


Figura 3.40. *Expresión del gen de la flavodoxina en plantas de Medicago truncatula mediante RT-PCR.* (WT) línea no transformada; (43) línea homocigotas del evento Fld-1; (C-) ausencia de molde (control negativo); (M) Marcador molecular en escalera de 100 pb (BIO-RAD).

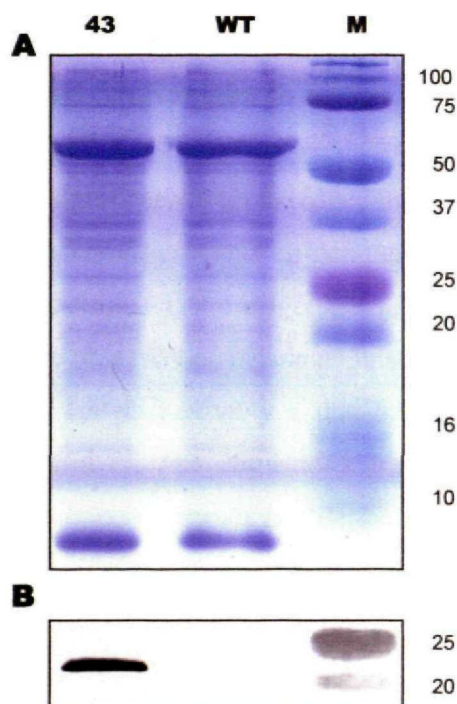


Figura 3.41. *Análisis de la expresión y acumulación de la proteína flavodoxina en plantas de Medicago truncatula.* A) SDS-PAGE teñido con azul de Comassie y B) Western blot e inmunodetección de la proteína antioxidante flavodoxina (23 kDa). (WT) línea no transformada; (43) línea homocigotas del evento Fld-1; (M) Marcador Precision Plus Protein Standard Dual Color (250-10 kDa) (BIO-RAD).

Para el análisis mediante *western blot*, se extrajeron las proteínas totales procedentes de las hojas recogidas de las plantas de *Medicago truncatula*. Las proteínas se separaron mediante electroforesis y se transfirieron a membrana. Se inmunodetectó flavodoxina en el extracto de las proteínas aisladas de *Medicago truncatula* T<sub>1</sub>-Fld1-43 (Figura 3.41B). La acumulación de la proteína antioxidante de 23 kDa inmunodetectada en el *western blot* no se apreció en el gel de proteínas teñido y utilizado como control de carga (Figura 3.41A).

La presencia del gen *fld* en el ADN genómico (Figura 3.39), la detección indirecta de ARNm de *fld* entre el ARN total (Figura 3.40) y la inmunodetección de la proteína Fld en los extractos proteicos de *Medicago truncatula* (Figura 3.41), demuestran la inserción y expresión constitutiva del gen de la flavodoxina de *Anabaena variabilis* en las plantas transformadas de *Medicago truncatula* mediante infección por *Agrobacterium tumefaciens* / pFLD.



## 6. Estudios preliminares del efecto de la flavodoxina en plantas transgénicas de *Medicago truncatula* crecidas en condiciones normales y sometidas a estrés salino

Se realizaron estudios preliminares del efecto de la proteína flavodoxina en plantas transgénicas de *Medicago truncatula* (T<sub>2</sub>-Fld1-43) expresando el gen *fld* sometidas a estrés salino. Se analizaron parámetros morfométricos de la planta, la capacidad fijadora de nitrógeno en simbiosis con *Sinorhizobium meliloti* 2011 wt y el metabolismo oxidativo y carbonado del nódulo.

En la línea estudiada, la transformación de las plantas con el gen *fld* no afectó al crecimiento y desarrollo de las plantas, ni a la capacidad de establecer simbiosis con *Sinorhizobium meliloti*.

### 6.1. Fijación de nitrógeno

Se evaluó la capacidad fijadora de nitrógeno de plantas transgénicas de *Medicago truncatula* inoculadas con *Sinorhizobium meliloti* 2011 wt y sometidas a estrés salino, mediante ensayos de reducción de acetileno (ARA). Se aplicó una concentración 100 mM de NaCl durante 3 días en plantas de 21 días (Figura 3.42). Se estimó la actividad nitrogenasa como  $\mu\text{moles}$  de acetileno reducidos a la hora por gramo fresco de nódulo ( $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ).

No hubo diferencias significativas en la reducción de acetileno de los nódulos de las plantas de *Medicago truncatula* crecidas en condiciones control: 40,7 y 42,8 mM  $\text{C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$  en las plantas control (wt) y transgénicas (T<sub>2</sub>-Fld-43), respectivamente. En presencia del estrés salino, se observó una bajada en la actividad nitrogenasa de un 52% ( $p \leq 0,05$ ) en los nódulos de las plantas wt y a una bajada del 32% ( $p \leq 0,05$ ) en los nódulos de las plantas T<sub>2</sub>-Fld-43, con respecto a los mismo nódulos crecidos en condiciones control. Aunque la reducción de acetileno de los nódulos de las plantas de *Medicago truncatula* T<sub>2</sub>-Fld-43 sometidas al estrés salino (29,1 mM  $\text{C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) fue mayor que la de los nódulos de las plantas control crecidos en las mismas condiciones (19,6 mM  $\text{C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ), las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

Se estudiaron parámetros morfométricos (peso de la parte aérea y de los nódulos, número de trifolios, y altura de la planta). No hubo diferencias significativas en el peso fresco y seco de la parte aérea de la planta, en el peso fresco de los nódulos, número de

trifolios ni altura de la planta, entre las plantas de *Medicago truncatula* (wt y T<sub>2</sub>-Fld-43) (datos no mostrados).

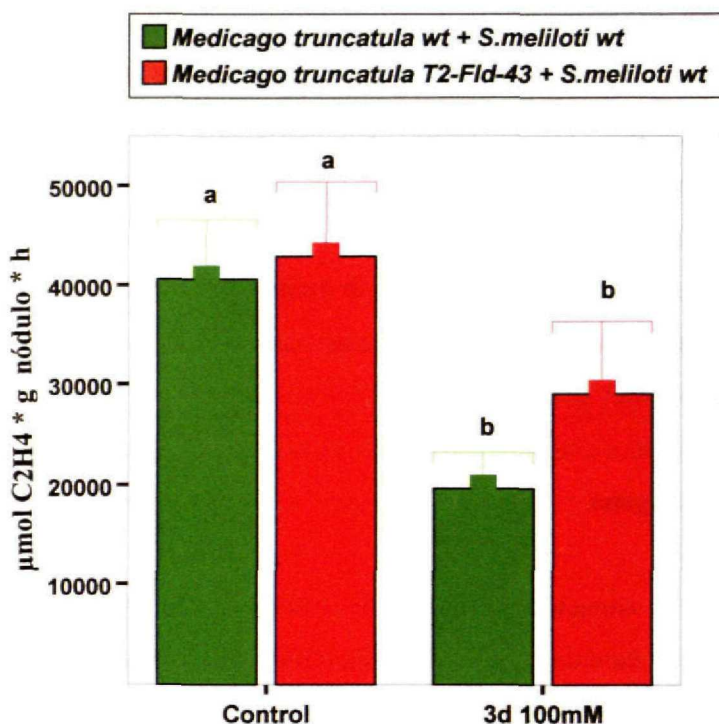


Figura 3.42. *Actividad fijadora de nitrógeno en condiciones de salinidad.* Ensayos de reducción de acetileno ( $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \text{ gr}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) en plantas de *Medicago truncatula* wt y T<sub>2</sub>-Fld-43 inoculadas con *Sinorhizobium meliloti* 2011 wt y tratadas a los 21 días con NaCl 100 mM durante 3 días. Los valores representan la media y las barras de error la desviación típica de la media. Las diferencias significativas se representan con diferentes letras ( $p \leq 0.05$ ; LSD).

## 6.2. Parámetros morfométricos

Se evaluaron algunos parámetros morfométricos representativos del estado fisiológico en plantas transgénicas de *Medicago truncatula* inoculadas con *Sinorhizobium meliloti* 2011 wt y sometidas a un estrés salino prolongado. Se aplicó una concentración 100 mM de NaCl durante 6 días en plantas de 21 días (Tabla 3.4).

No hubo diferencias significativas en el peso fresco y peso seco de las partes aéreas de las plantas de *Medicago truncatula* (wt y T<sub>2</sub>-Fld-43) en condiciones control y sometidas al estrés salino (6d 100 mM NaCl). Se observó un aumento no significativo del peso aéreo fresco (15%) en presencia del estrés salino. En el caso del peso aéreo seco, se observó un descenso no significativo (4-13%) en presencia del estrés salino.



No hubo diferencias significativas en el peso fresco y peso seco de las raíces de las plantas de *Medicago truncatula* (wt y T<sub>2</sub>-Fld-43) en condiciones control. Se observó un descenso significativo del peso de la raíz fresca (23%) y seca (27%) en las plantas control de *Medicago truncatula* en presencia del estrés salino. En el caso de las plantas transgénicas sometidas a estrés salino, se observó un descenso no significativo: 14% en el peso de la raíz fresca y 21% en el peso seco de la raíz. No hubo diferencias significativas en el peso fresco y peso seco de las raíces de las plantas de *Medicago truncatula* wt en condiciones control y las plantas de *Medicago truncatula* T<sub>2</sub>-Fld-43 sometidas al estrés salino.

<span style="color: green;">■</span> <i>Medicago truncatula</i> wt + <i>S. meliloti</i> wt
<span style="color: red;">■</span> <i>Medicago truncatula</i> T <sub>2</sub> -Fld-43 + <i>S. meliloti</i> wt

	Control	Control	6d 100mM	6d 100mM
Peso aéreo fresco (g.)	0,2221a	0,2274a	0,2551a	0,2613a
Peso aéreo seco (g.)	0,0296a	0,0302a	0,0257a	0,0313a
Peso raíz fresco (g.)	0,1701a	0,1679a	0,1310b	0,1442ab
Peso raíz seco (g.)	0,0116a	0,0119a	0,0085b	0,0094ab
Altura aérea (cm.)	7,2a	7,3a	5,6b	6,1ab
Nº trifolios	5,9ab	6,47a	4,2c	5,2bc
Nº nódulos	5,7ab	6,2a	4,7b	5,0ab
Nº lóbulos	8,7a	8,3a	7,2a	7,5a
nódulos monolobulados	3,9ab	4,9a	3,3b	3,7ab
nódulos bilobulados	1,1a	0,7a	0,6a	0,5a
nódulos trilobulados	0,5a	0,27a	0,13a	0,4a
nódulos tetralobulados	0,13a	0,2a	0,2a	0,2a
nódulos pentalobulados	0,13a	0,07a	0,07a	0,13a
Peso nódulos fresco (g.)	0,0125a	0,0128a	0,0063b	0,0071a
Peso nódulos seco (g.)	0,0014a	0,0013ab	0,0008b	0,0011ab
Peso nódulo fresco (unid) (g.)	0,0022a	0,0023a	0,0014b	0,0016ab

Tabla 3.4. **Parámetros morfológicos.** Evaluación de parámetros morfológicos en plantas de *Medicago truncatula* wt y T<sub>2</sub>-Fld-43 inoculadas con *Sinorhizobium meliloti* 2011 wt y tratadas a los 21 días con NaCl 100 mM durante 6 días. Los valores representan la media. Las diferencias significativas se representan con diferentes letras ( $p \leq 0.05$ ; LSD).

No se observaron diferencias significativas en la altura de la parte aérea de las plantas de *Medicago truncatula* (wt y T<sub>2</sub>-Fld-43) en condiciones control. Se observó un descenso en la altura de la parte aérea de las plantas de *Medicago truncatula* sometidas a estrés salino. En las plantas control, hubo un descenso del 22% ( $p \leq 0,05$ ) y en la

plantas transgénicas el descenso fue del 16% (no significativo). No hubo diferencias significativas en la altura de la parte aérea de las plantas de *Medicago truncatula* wt en condiciones control y las plantas de *Medicago truncatula* T<sub>2</sub>-Fld-43 sometidas al estrés salino.

No hubo diferencias significativas en el número de trifolios de las plantas de *Medicago truncatula* (wt y T<sub>2</sub>-Fld-43) en condiciones control. Se observó un descenso significativo en el número de trifolios similar en las plantas wt y T<sub>2</sub>-Fld-43 de *Medicago truncatula* en presencia del estrés salino. No obstante, no hubo diferencias significativas en el número de trifolios de las plantas de *Medicago truncatula* wt en condiciones control y las plantas de *Medicago truncatula* T<sub>2</sub>-Fld-43 sometidas al estrés salino.

No se observaron diferencias significativas en número de nódulos de las plantas de *Medicago truncatula* (wt y T<sub>2</sub>-Fld-43) en condiciones control y sometidas al estrés salino. Igualmente no hubo diferencias significativas en el número de lóbulos total, ni en la distribución de los tipos de nódulos en función del número de lóbulos (mono-, bi-, tri-, tetra- y pentalobulados).

No hubo diferencias significativas en el peso fresco y peso seco de los nódulos de las plantas de *Medicago truncatula* (wt y T<sub>2</sub>-Fld-43) en condiciones control. Se observó un descenso significativo del peso fresco de los nódulos (50%) y peso seco (43%) en las plantas control de *Medicago truncatula* en presencia del estrés salino. En el caso de las plantas transgénicas sometidas a estrés salino, se observó un descenso no significativo: 44% y 15% en el peso fresco y seco de los nódulos respectivamente. No se observaron diferencias significativas en el peso fresco de nódulo (unidad) de las plantas de *Medicago truncatula* (wt y T<sub>2</sub>-Fld-43) en condiciones control y sometidas al estrés salino.

### 6.3. Metabolismo oxidativo

Se analizaron la actividad superóxido dismutasa y catalasa y se determinaron las principales actividades, metabolitos e índices del ciclo ascorbato-glutation.

Se determinó la actividad superóxido dismutasa en los nódulos de las plantas transgénicas de *Medicago truncatula* inoculadas con *Sinorhizobium meliloti* 2011 wt y sometidas a estrés salino (21d + 3d 100 mM NaCl). Se expresó la actividad específica como unidades por mg de proteína o g de peso seco de nódulo (Figura 3.43A y Tabla 3.5).



No hubo diferencias significativas en las estimaciones de la actividad SOD de los nódulos de las plantas de *Medicago truncatula* (wt y T<sub>2</sub>-Fld-43) en condiciones control ni en presencia de estrés salino (21d + 3d 100 mM NaCl). Se observó un descenso significativo de la actividad SOD por efecto del estrés salino. En las plantas control, hubo un descenso del 12% y 27% según la estimación de la actividad SOD, y en la plantas transgénicas el descenso fue del 18% y 42%.

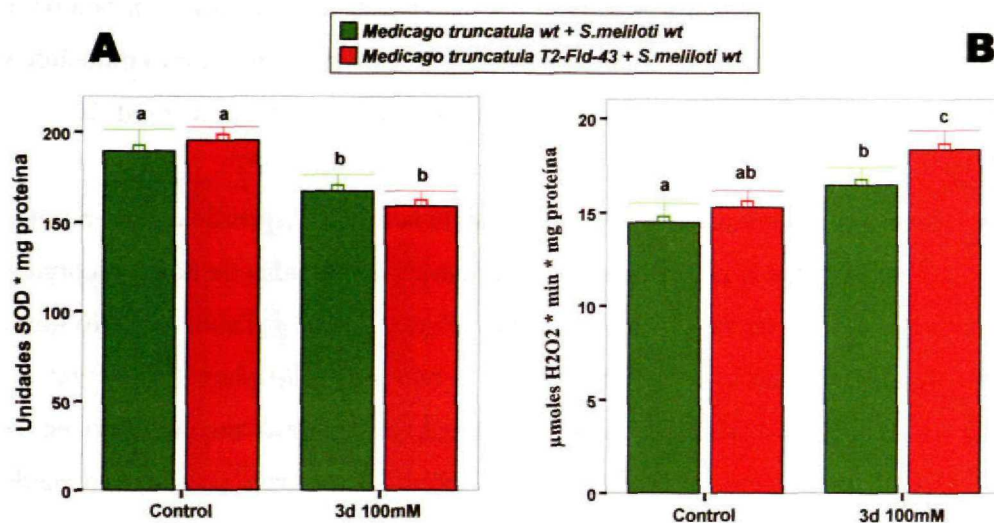


Figura 3.43. *Actividades superóxido dismutasa y catalasa.* Determinación de la actividad SOD (A) y CAT (B) en nódulos de plantas de *Medicago truncatula* wt y T<sub>2</sub>-Fld-43 inoculadas con *Sinorhizobium meliloti* 2011 wt y tratadas a los 21 días con NaCl 100 mM durante 3 días. La actividad específica se relativizó a mg de proteína. Los valores representan la media de 7 determinaciones y las barras de error la desviación típica de la media. Las diferencias significativas están representadas con diferentes letras ( $p \leq 0.05$ ; LSD).

Se determinó la actividad catalasa en los nódulos de las plantas transgénicas de *Medicago truncatula* inoculadas con *Sinorhizobium meliloti* 2011 wt y sometidas a estrés salino (21d + 3d 100 mM NaCl). Se expresó la actividad específica como  $\mu$ moles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidados por minuto y mg de proteína o g de peso seco de nódulo (Figura 3.43B y Tabla 3.5).

La actividad catalasa fue mayor en los nódulos de las plantas transgénicas de *Medicago truncatula* (T<sub>2</sub>-Fld-43). En condiciones control hubo entre un 6% (no significativo) y un 14% ( $p \leq 0.05$ ) más de actividad catalasa con respecto a las plantas control según la estimación de la actividad catalasa. En presencia del estrés salino, hubo entre un 11% ( $p \leq 0.05$ ) y un 9% ( $p \leq 0.05$ ) más de actividad catalasa con respecto a las plantas control según la estimación de la actividad catalasa. En general, se observó un

aumento significativo de la actividad catalasa por efecto del estrés salino. No hubo diferencias significativas en la actividad catalasa de los nódulos de las plantas de *Medicago truncatula* T<sub>2</sub>-Fld-43 en condiciones control y las plantas control sometidas al estrés salino.

Se determinaron las principales actividades del ciclo ascorbato-glutation: ascorbato peroxidasa, monodehidroascorbato reductasa, dehidroascorbato reductasa y glutathione reductasa (Figura 3.44 y Tabla 3.5), se midió el contenido de glutathione oxidado y reducido y se calcularon los balances redox para el glutathione (Figura 3.45 y Tabla 3.5) en los nódulos de las plantas transgénicas de *Medicago truncatula* inoculadas con *Sinorhizobium meliloti* 2011 wt y sometidas a estrés salino (21d + 3d 100mM NaCl).

Se determinó la actividad APX y se expresó la actividad específica como nmoles de ácido ascórbico oxidados por minuto y mg de proteína o  $\mu$ moles de ácido ascórbico oxidados por minuto y g de peso seco de nódulo (Figura 3.44A y Tabla 3.5). No hubo diferencias significativas en la actividad APX de los nódulos de las plantas de *Medicago truncatula* (wt y T<sub>2</sub>-Fld-43) en condiciones control. Se observó un descenso en la actividad APX de los nódulos de las plantas de *Medicago truncatula* sometidas a estrés salino. En las plantas control, hubo un descenso de aproximadamente 16% ( $p \leq 0,05$ ) y en la plantas transgénicas hubo un descenso no significativo del 4%. Según la estimación de  $\mu$ moles de ácido ascórbico oxidados por minuto y g de peso seco de nódulo, no hubo diferencias significativas en la actividad APX de los nódulos entre las plantas de *Medicago truncatula* wt en condiciones control y las plantas de *Medicago truncatula* T<sub>2</sub>-Fld-43 sometidas al estrés salino.

Se determinó la actividad MDHAR y se expresó la actividad específica como nmoles de NADH oxidados por minuto y mg de proteína o  $\mu$ moles de NADH oxidados por minuto y g de peso seco de nódulo (Figura 3.44B y Tabla 3.5). No se observaron diferencias significativas en las estimaciones de la actividad MDHAR de los nódulos de las plantas de *Medicago truncatula* (wt y T<sub>2</sub>-Fld-43) en condiciones control, ni entre ambos tipos de nódulos en la situación de estrés salino (21d + 3d 100 mM NaCl). Se observó un descenso significativo (28%) de la actividad MDHAR de los nódulos similar en las plantas wt y T<sub>2</sub>-Fld-43 de *Medicago truncatula* en presencia del estrés salino.

Se determinó la actividad DHAR y se expresó la actividad específica como nmoles de ácido ascórbico oxidados por minuto y mg de proteína o  $\mu$ moles de ácido ascórbico oxidados por minuto y g de peso seco de nódulo (Figura 3.44C y Tabla 3.5).



No hubo diferencias significativas en las estimaciones de la actividad DHAR de los nódulos de las plantas de *Medicago truncatula* (wt y T<sub>2</sub>-Fld-43) en condiciones control, ni en la situación de estrés salino (21d + 3d 100 mM NaCl). Se observó un descenso de la actividad DHAR de los nódulos de las plantas de *Medicago truncatula* en presencia del estrés salino. En las plantas control, hubo un descenso de aproximadamente 30% ( $p \leq 0,05$ ) y en la plantas transgénicas hubo un descenso menor (18%) pero igualmente significativo.

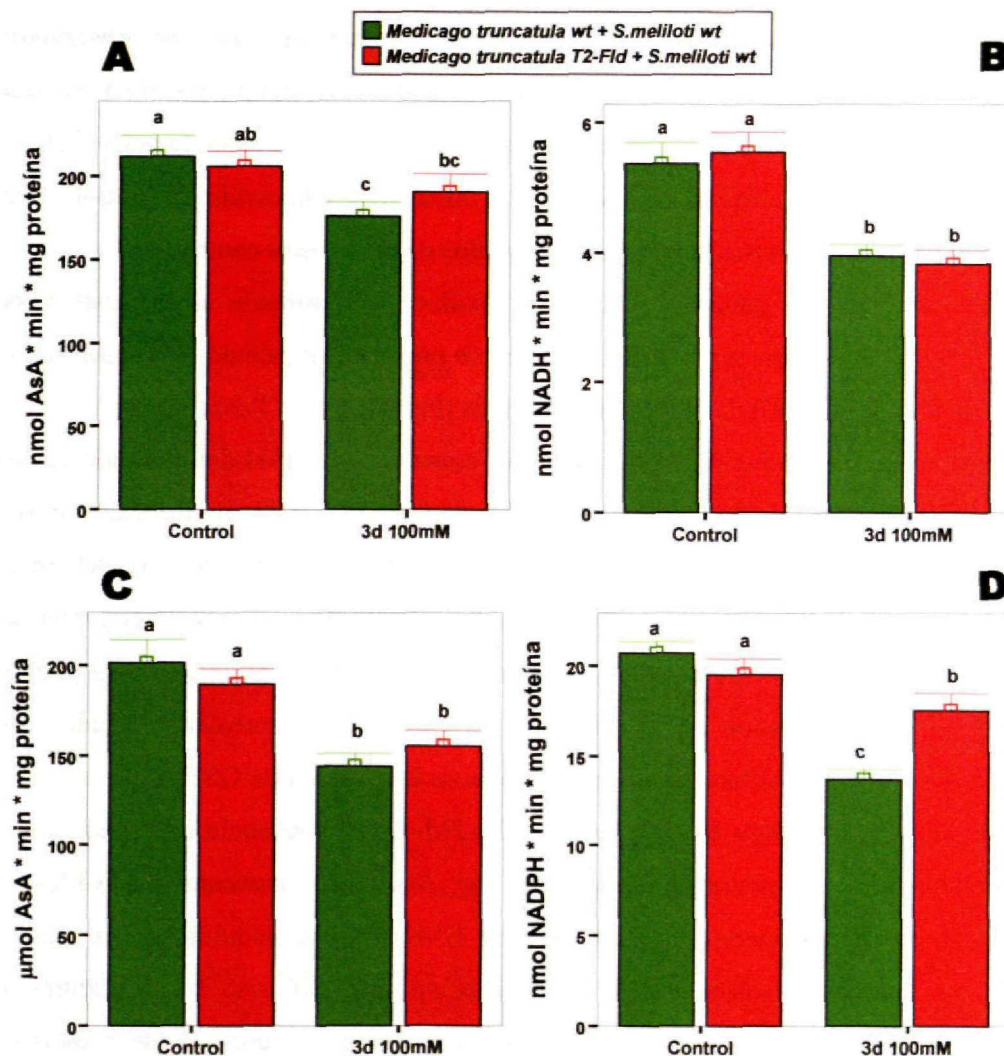


Figura 3.44. *Actividades enzimáticas del ciclo ascorbato-glutation*. Determinaciones enzimáticas en nódulos de plantas de *Medicago truncatula* wt y T<sub>2</sub>-Fld-43 inoculadas con *Sinorhizobium meliloti* 2011 wt y tratadas a los 21 días con NaCl 100 mM durante 3 días. (A) APX, ascorbato peroxidasa; (B) MDHAR, monodehidroascorbato reductasa; (C) DHAR, dehidroascorbato reductasa; (D) GR, glutatión reductasa. Las actividades específicas se relativizaron a mg de proteína. Los valores representan la media de 7 determinaciones y las barras de error la desviación típica de la media. Las diferencias significativas están representadas con diferentes letras ( $p \leq 0,05$ ; LSD).

Se determinó la actividad GR y se expresó la actividad específica como nmoles de NADPH oxidados por minuto y mg de proteína o  $\mu$ moles de NADPH oxidados por minuto y g de peso seco de nódulo (Figura 3.44D y Tabla 3.5). No hubo diferencias en la actividad GR de los nódulos de las plantas de *Medicago truncatula* (wt y T<sub>2</sub>-Fld-43) en condiciones control. Se observó un descenso de la actividad GR de los nódulos de las plantas de *Medicago truncatula* en presencia del estrés salino. En las plantas control, hubo un descenso del 25-34% ( $p \leq 0,05$ ) dependiendo de la estimación de la actividad GR, y en la plantas transgénicas hubo un descenso del 10% ( $p \leq 0,05$ ) y del 7% (no significativo) dependiendo de la estimación de la actividad GR. Se observaron diferencias significativas en la actividad GR de los nódulos de las plantas de *Medicago truncatula* (wt y T<sub>2</sub>-Fld-43) en presencia de estrés salino. En este caso, la actividad GR de los nódulos de las plantas transgénicas de *Medicago truncatula* (T<sub>2</sub>-Fld-43) fue mayor (28-14%) que la actividad GR de los nódulos de las plantas control.

El contenido de glutation reducido y oxidado determinado se expresó como nmoles por mg de proteína o por g de peso seco de nódulo y se calculó el balance redox del glutation (GSH/GSSG) de ambas estimaciones (Figura 3.45 y Tabla 3.5).

No hubo diferencias significativas en el contenido de GSH determinado en los nódulos de las plantas de *Medicago truncatula* (wt y T<sub>2</sub>-Fld-43) en condiciones control. Se observó un descenso en la cantidad de GSH determinado en presencia del estrés salino. En los nódulos de las plantas control se observó una disminución en el contenido de GSH de aproximadamente 26% ( $p \leq 0,05$ ) mientras que en los nódulos de las plantas transgénicas, la disminución en el contenido de GSH fue de aproximadamente 13% ( $p \leq 0,05$ ). Se observaron diferencias significativas en la cantidad de GSH de los nódulos de las plantas de *Medicago truncatula* (wt y T<sub>2</sub>-Fld-43) en presencia de estrés salino. Los nódulos de las plantas transgénicas de *Medicago truncatula* (T<sub>2</sub>-Fld-43) presentaban aproximadamente un 13% más de GSH que los nódulos de las plantas control. Al igual que ocurre con la determinación del GSH, no hubo diferencias significativas en la cantidad del GSSG determinado de los nódulos de las plantas de *Medicago truncatula* (wt y T<sub>2</sub>-Fld-43) en condiciones control. Se observó un incremento en la cantidad de GSH determinado en presencia del estrés salino. En los nódulos de las plantas control se observó una subida entre 75-145% ( $p \leq 0,05$ ) dependiendo de la estimación del GSSG, mientras que en los nódulos de las plantas transgénicas la subida fue de aproximadamente 32-123% ( $p \leq 0,05$ ) dependiendo de la estimación del GSSG. Se observaron diferencias significativas en la cantidad de GSSG



de los nódulos de las plantas de *Medicago truncatula* (wt y T<sub>2</sub>-Fld-43) en presencia de estrés salino. Los nódulos de las plantas control de *Medicago truncatula* (wt) presentaban aproximadamente un 18% más de GSSG que los nódulos de las plantas transgénicas (T<sub>2</sub>-Fld-43).

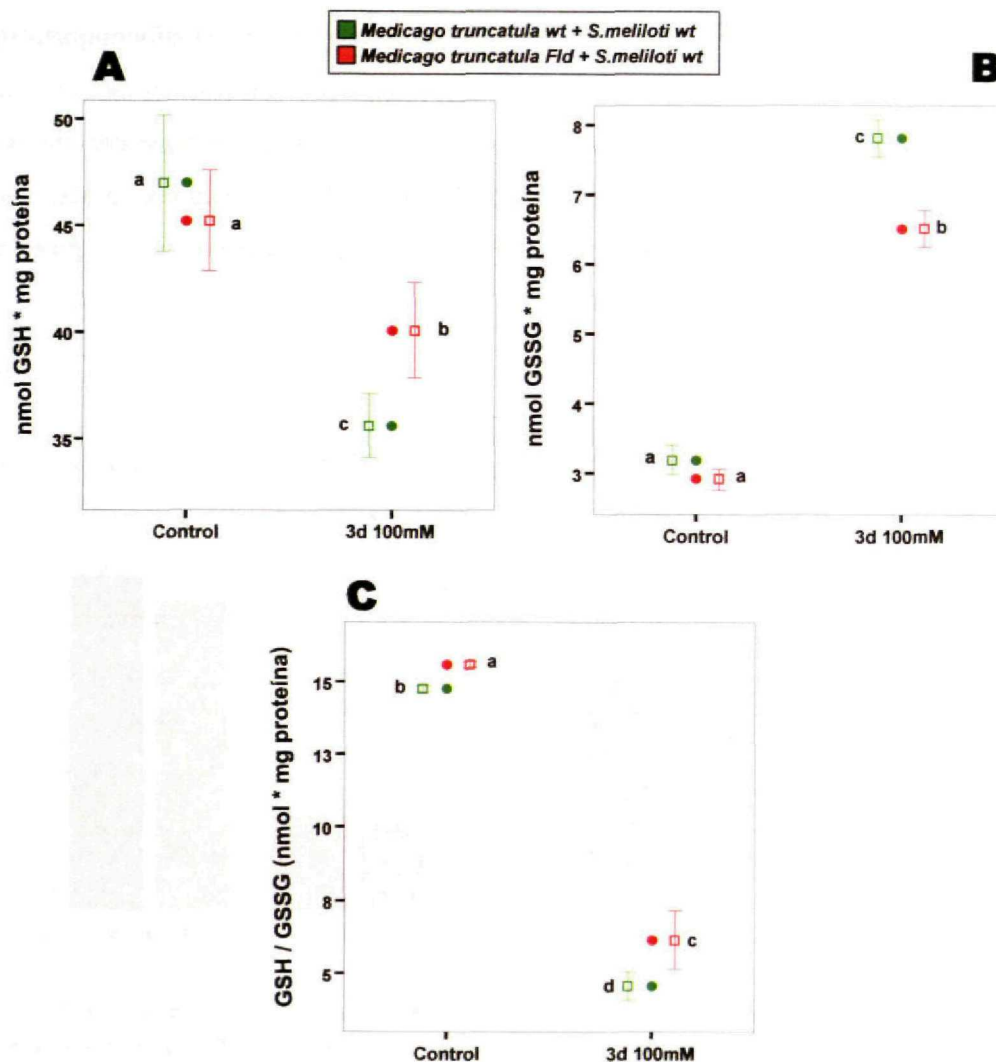


Tabla 3.45. **Glutation.** Determinación del glutathion reducido y oxidado y cálculo del balance redox del glutathion (GSH/GSSG) en nódulos de plantas de *Medicago truncatula* wt y T<sub>2</sub>-Fld-43 inoculadas con *Sinorhizobium meliloti* 2011 wt y tratadas a los 21 días con NaCl 100 mM durante 3 días. (A) GSH, glutathion reducido; (B) GSSG, glutathion oxidado; (C) GSH/GSSG, balance redox del glutathion. La cantidad de glutathion se relativizó a mg de proteína. Los valores representan la media de 9 determinaciones y las barras de error la desviación típica de la media. Las diferencias significativas están representadas con diferentes letras ( $p \leq 0.05$ ; LSD).

Se observaron diferencias significativas en el balance redox de glutathion de los nódulos de las plantas sometidas a estrés salino. En estas condiciones, se apreció un

balance significativamente más positivo en los nódulos de las plantas transgénicas de *Medicago truncatula* (T<sub>2</sub>-Fld-43).

6.4. Metabolismo carbonado

Se estudiaron las actividades enzimáticas sacarosa sintasa y fosfoenolpiruvato carboxilasa representativas del metabolismo carbonado del nódulo, en nódulos de plantas transgénicas de *Medicago truncatula* inoculadas con *Sinorhizobium meliloti* 2011 wt y sometidas a estrés salino (21d + 3d 100 mM NaCl). Se expresó la actividad específica como nmoles de NADPH o NADH oxidado al minuto por mg de proteína respectivamente (Figura 3.46 y Tabla 3.5).

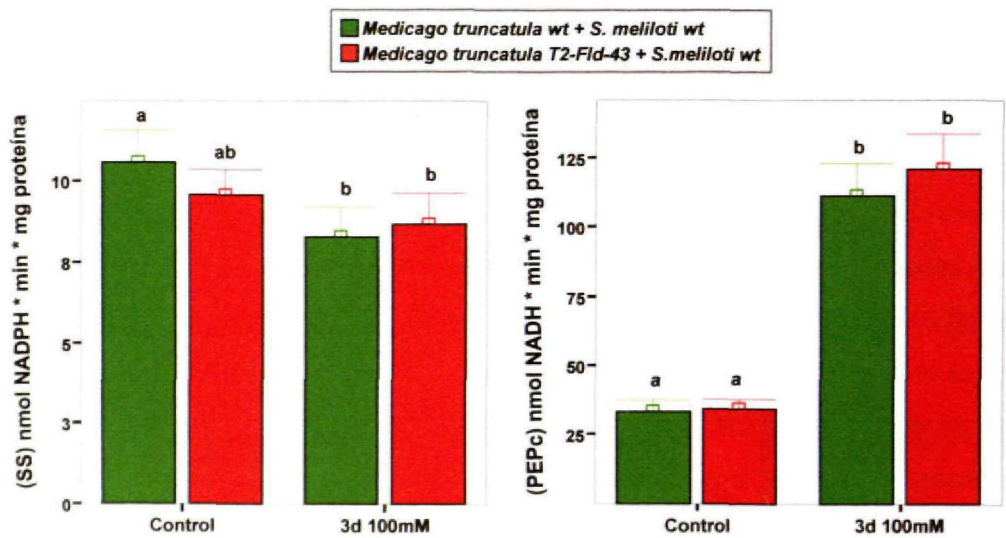


Figura 3.46 *Actividades sacarosa sintasa (SS) y fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPc).* Determinación de las actividades SS y PEPc en nódulos de plantas de *Medicago truncatula* wt y T<sub>2</sub>-Fld-43 inoculadas con *Sinorhizobium meliloti* 2011 wt y tratadas a los 21 días con NaCl 100 mM durante 3 días. La actividad específica se expresó como  $\mu$ moles de NADPH ó NADH oxidado por minuto y relativizado a mg de proteína. Los valores representan la media de 8 determinaciones y las barras de error la desviación típica de la media. Las diferencias significativas están representadas con diferentes letras ( $p \leq 0.05$ ; LSD).

No se observaron diferencias significativas en la actividad SS de los nódulos en las plantas de *Medicago truncatula* (wt y T<sub>2</sub>-Fld-43) en condiciones control y en presencia del estrés salino. Se observó un descenso de actividad SS de los nódulos en presencia del estrés salino. En los nódulos de las plantas control se observó una caída en



la actividad SS de aproximadamente el 22% ( $p \leq 0,05$ ) mientras que en los nódulos de las plantas transgénicas la bajada fue de aproximadamente un 9% (no significativa).

No hubo diferencias significativas en la actividad PEPc de los nódulos en las plantas de *Medicago truncatula* (wt y T<sub>2</sub>-Fld-43). Se observó un incremento significativo en la actividad PEPc en presencia del estrés salino similar (2,4 veces aproximadamente) en los nódulos de las plantas wt y T<sub>2</sub>-Fld-43.

■ <i>Medicago truncatula</i> wt + <i>S.meliloti</i> wt
■ <i>Medicago truncatula</i> T2-Fld-43 + <i>S.meliloti</i> wt

	Control	Control	3d 100 mM	3d 100 mM
<b>SOD</b>				
Unids SOD mg <sup>-1</sup> proteína	189,79a	195,63a	167,19b	159,18b
Unids SOD g <sup>-1</sup> nódulo sec	12,41a	13,98a	9,06b	8,04b
<b>CAT</b>				
μmol min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> proteína	14,47a	15,31ab	16,46b	18,34c
μmol min <sup>-1</sup> g <sup>-1</sup> nódulo sec	409,50a	468,26b	475,06b	522,22c
<b>APX</b>				
nmol min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> proteína	211,92a	206,08ab	176,32c	190,77bc
μmol min <sup>-1</sup> g <sup>-1</sup> nódulo sec	124,10a	124,12a	105,95c	118,87b
<b>MDHAR</b>				
nmol min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> proteína	5,37a	5,55a	3,94b	3,81b
μmol min <sup>-1</sup> g <sup>-1</sup> nódulo sec	52,75a	51,79a	37,89b	39,27b
<b>DHAR</b>				
μmol min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> proteína	201,93a	189,53a	144,49b	155,26b
μmol min <sup>-1</sup> g <sup>-1</sup> nódulo sec	8,63a	8,20a	5,84b	6,67b
<b>GR</b>				
nmol min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> proteína	20,72a	19,50a	13,72c	17,54b
μmol min <sup>-1</sup> g <sup>-1</sup> nódulo sec	71,10a	65,58ab	53,58c	61,03b
<b>GSH</b>				
nmol mg <sup>-1</sup> proteína	47,01a	45,23a	35,61c	40,11b
nmol g <sup>-1</sup> nódulo sec	241,89a	229,91a	171,96c	195,85b
<b>GSSG</b>				
nmol mg <sup>-1</sup> proteína	3,19a	2,91a	7,81c	6,51b
nmol g <sup>-1</sup> nódulo sec	18,09a	20,41a	31,32c	27,06b
<b>GSH/GSSG</b>				
(mg <sup>-1</sup> proteína)	14,74b	15,55a	4,56d	6,16c
(g <sup>-1</sup> nódulo sec)	13,43a	11,28a	5,49c	7,25b

	Control	Control	3d 100 mM	3d 100 mM
SS				
nmol mg-1 proteína	10,59a	9,57ab	8,28b	8,69b
PEPc				
nmol mg-1 proteína	33,08a	34,20a	111,13b	121,04b

Tabla 3.5. **Metabolismo oxidativo y carbonado.** Determinaciones de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos del metabolismo oxidativo y actividades enzimáticas del metabolismo carbonado en nódulos de plantas de *Medicago truncatula* wt y T<sub>2</sub>-Fld-43 inoculadas con *Sinorhizobium meliloti* 2011 wt y tratadas a los 21 días con NaCl 100 mM durante 3 días. SOD, superóxido dismutasa; CAT, catalasa; APX, ascorbato peroxidasa; MDHAR, monodehidroascorbato peroxidasa; DHAR, dehidroascorbato peroxidasa; GR, glutathion reductasa; GSH, glutathion reducido; GSSG, glutathion oxidado; GSH/GSSG, balance redox del glutathion. Los valores representan la media de 7-9 determinaciones Las diferencias significativas están representadas con diferentes letras ( $p \leq 0.05$ ; LSD).



## Discusión

---

## 1. Expresión de la proteína flavodoxina de *Anabaena variabilis* PCC 7119 en bacterias y bacteroides

El vector pTrc99a (Amman *et al.*, 1988) constituye un sistema sencillo y eficaz para la expresión de proteínas en un organismo fácilmente transformable y de rápido crecimiento como *Escherichia coli*. Se comprobó la expresión de la flavodoxina mediante *western blot* en los extractos de proteínas de las bacterias de *Escherichia coli*. Además de la expresión inducida por IPTG de la flavodoxina, se observó una expresión basal en ausencia de la inducción del promotor.

El mantenimiento del vector de expresión en las bacterias a lo largo de las generaciones, necesita de la presión selectiva por la presencia de ampicilina. La incorporación del agente selectivo imposibilita estudios de interacción planta-microorganismo en experimentos controlados de bacterias de vida libre o asociativas tales como *Pseudomonas fluorescens* (rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal) o como *Sinorhizobium meliloti* (rizobacterias fijadoras de nitrógeno). La ausencia del agente selectivo supone la pérdida del plásmido y por tanto, la ausencia de expresión y acumulación de flavodoxina en bacterias aisladas de la rizosfera o en bacteroides recuperados de los nódulos de leguminosas.

Existen varias familias de vectores de expresión que utilizan diferentes mecanismos para su mantenimiento estable en las cepas bacterianas, tales como partición activa (Meyer, 1979), sistemas de resolución de multimeros (Grinter *et al.*, 1989) ó eliminación post-segregacional (Helinski *et al.*, 1996; Rawlings, 1999; Gerdes, 2000). Algunos de estos mecanismos son eficientes para el mantenimiento de los plásmidos en las rizobacterias y en los bacteroides de *Rhizobium* spp. y por tanto idóneos para estudios de interacción planta-microorganismo. Para la expresión de genes en bacterias de vida libre y durante la simbiosis, existen promotores de expresión inducida, tales como el promotor de la  $\gamma$ -aminobutirato (GABA) aminotrasferasa (*pgabT*) (Prell *et al.*, 2002) inducible por GABA (elevada expresión en la zona simbiótica) y reprimido por succinato ó promotores de expresión constitutiva como el promotor de la neomicina fosfotransferasa (*pnptII*).

Para la expresión constitutiva y estable de la proteína flavodoxina de la cianobacteria *Anabaena variabilis* PCC 7119 en bacterias de vida libre de *Pseudomonas fluorescens* así como bacterias y bacteroides de *Sinorhizobium meliloti* se utilizó el vector pFAJ1709 (Dombrecht *et al.*, 2001). El plásmido pertenece a una familia de



vectores de clonaje derivados de RK2 (*IncPa*) y utilizables para el estudio de expresión génica mediante el promotor constitutivo *nptII*. Se ha descrito la elevada estabilidad de esta familia de vectores en bacterias en vida libre y bacteroides de *Rhizobium etli* CNPAF512 (Dombrecht et al., 2001). Se trata por tanto de un sistema de expresión muy estable en comparación con otros sistemas utilizados en el estudio de bacterias en simbiosis tales como pVK101, pLAFR3 ó pRK415 (Keen et al., 1988; Knauf y Nester, 1982; Staskawicz et al., 1987).

Se comprobó la presencia del gen de la flavodoxina mediante amplificación por PCR en bacterias de vida libre de *Pseudomonas fluorescens* y *Sinorhizobium meliloti* y bacteroides de *Sinorhizobium meliloti* de nódulos de *Medicago sativa*. La detección del gen corrobora el mantenimiento del plásmido pFAJ1709-Fld a lo largo de las generaciones en estas bacterias y bacteroides. Se comprobó igualmente, la expresión constitutiva del gen mediante *western blot* en los extractos de proteínas de estas bacterias de vida libre y bacteroides. En la inmunodetección, se observó una expresión constitutiva de la flavodoxina en las bacterias de vida libre de *Pseudomonas fluorescens* y *Sinorhizobium meliloti* similar a la expresión basal inmunodetectada en las bacterias de *Escherichia coli* portadoras del plásmido pTrc99a-Fld en ausencia de IPTG. La inmunodetección de flavodoxina en extractos de proteínas de nódulos de plantas de *Medicago sativa* inoculadas con *Sinorhizobium meliloti* pFAJ1709-Fld corrobora el mantenimiento del plásmido pFAJ1709-Fld y la operatividad del promotor *nptII* en la expresión del gen de la flavodoxina.

## 2. Efecto de la flavodoxina en bacterias sometidas a estrés oxidativo en vida libre

Antes de acometer el estudio del efecto de la proteína flavodoxina en la simbiosis *Sinorhizobium meliloti* – *Medicago sativa*, se evaluó la capacidad protectora de la flavodoxina expresada en bacterias sometidas a estrés oxidativo en vida libre.

Se utilizaron bacterias de *Escherichia coli*, dado que constituye el modelo bacteriano por excelencia (Rosenblueth y Wiener, 1945), *Pseudomonas fluorescens*, por su importancia como bacterias del suelo promotoras del crecimiento de las plantas (Barea et al., 2005; Lucas-García et al., 2003) y *Sinorhizobium meliloti*.

Para la imposición del estrés oxidativo, se utilizaron diferentes agentes oxidantes: peróxido de hidrógeno, metilviológeno y atrazina. El peróxido de hidrógeno constituye en sí mismo una especie reactiva de oxígeno de tipo no radical. Buena parte

de su toxicidad reside en la facultad de generar el radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ) en presencia de hierro libre a través de la reacción de Fenton (Fenton, 1894; 1899; Haber y Weiss, 1934). El metilviológeno (1,1-dimetil- 4,4-bipiridinium-dicloro) también conocido como paraquat, es un herbicida de tipo bipyridílico. En las plantas actúan desviando los electrones del fotosistema I. Debido a su capacidad para propagar radicales superóxido ha sido extensamente utilizado en estudios de estrés oxidativo en bacterias. El tratamiento conduce a la generación de radicales superóxido y la formación de peróxido de hidrógeno de forma espontánea o mediante la dismutación de los radicales superóxidos por SODs (Fridovich, 1978). La atrazina, (2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-s-triazina) es el herbicida más utilizado entre los de tipo anillo de triazina y presenta una notable capacidad para la inducción de estrés oxidativo. En las plantas bloquea la transferencia de electrones entre las quinonas del fotosistema II. La elección de estos herbicidas en la evaluación de la tolerancia al estrés oxidativo de las bacterias es debida no solo a su capacidad para inducir estrés oxidativo sino al impacto que ocasionan en las comunidades microbianas de los suelos.

La expresión de la flavodoxina de *Anabaena* en las tres bacterias estudiadas ha proporcionado una mayor tolerancia al estrés oxidativo generado directamente por el peróxido de hidrógeno e indirectamente por los herbicidas metilviológeno y atrazina.

Las bacterias de *Sinorhizobium meliloti* son las menos tolerantes a los agentes oxidantes, seguidas de las bacterias de *Pseudomonas fluorescens* y *Escherichia coli*, debido en parte a los tiempos de crecimiento y exposición a los tóxicos (48, 36 y 24 horas respectivamente). En las bacterias de *Escherichia coli* la expresión inducida y basal de la proteína flavodoxina de *Anabaena* proporciona una protección similar. Parece por tanto que la concentración de la proteína expresada en la bacteria no es un factor de incremento en la protección generada.

La obtención de un aumento en la tolerancia al estrés oxidativo en una bacteria modelo como *Escherichia coli* de la que se conocen multitud de datos fisiológicos, bioquímicos y genéticos y de la que se disponen numerosos mutantes, nos permitirá estudiar más fácilmente los posibles mecanismos mediante los cuales la sobreexpresión de la proteína flavodoxina genera esta protección.

La utilización de herbicidas es una práctica agrícola muy común y necesaria para algunos cultivos y zonas. Existen algunos factores a tener en cuenta en el uso de los herbicidas: composición, adsorción, movilidad, y tasa de degradación, que son fundamentales para analizar el posible impacto sobre la estructura de las comunidades



microbianas, las interacciones beneficiosas planta-microorganismo, y los efectos fitotóxicos residuales. En este sentido, existen numerosos trabajos que reflejan las alteraciones estructurales que originan en las comunidades microbianas debidas a las deficiencias en las tasas de respiración (Roslycky, 1976; Dzanter y Felsot, 1991; Tu, 1992; Chang *et al.*, 2001; Seghers *et al.*, 2003). Igualmente se han descrito los efectos negativos sobre el establecimiento de las asociaciones y relaciones simbióticas (Clark y Mahanty, 1991; Eberbach y Douglas, 1991; Flores y Barbachano, 1992) y la efectividad de los procesos que en ellas se desarrollan (Mallik y Tesfai, 1985; Abdalla y Omar, 1993; Zabaloy y Gómez, 2005).

En el caso de la atrazina y fundamentalmente debido a su persistencia en los suelos (Solomon *et al.*, 1996; Ralebitso *et al.*, 2002; Park *et al.*, 2003) se han realizado numerosos estudios sobre la degradación de estos compuestos y la biorremediación de los suelos contaminados. Se han aislado multitud de bacterias degradadoras de atrazina (Mandelbaum *et al.*, 1993; Bouquard *et al.*, 1997; Struthers *et al.*, 1998; Fadullon *et al.*, 1998; Topp, 2001; Piutti *et al.*, 2003; Topp *et al.*, 2004; Radosevich y Tuovinen, 2004; Ghosh y Philip, 2004; Zhao *et al.*, 2005; Popov *et al.*, 2005), se han identificado genes y rutas metabólicas de degradación (Mandelbaum *et al.*, 1995; Ma y Selim, 1996; De Souza *et al.*, 1996; Boundy-Mills *et al.*, 1997; Karns, 1999; Katz *et al.*, 2000; Martínez *et al.*, 2001) e incluso se han diseñado y transformado bacterias (Strong *et al.*, 2000; Hirkala y Germina, 2004) y plantas (Wang *et al.*, 2005) para su degradación.

Por su parte, la inmovilización y desactivación del metilviológeno (Riley *et al.*, 1976; Ashton y Crafts, 1981; Roberts *et al.*, 2002) reduce considerablemente su dispersión en los suelos (Bromilov, 2003). No obstante, se han estudiado y aislado bacterias con capacidad de degradación de metilviológeno (Murria *et al.*, 1997) e incluso se han identificado diferentes genes que confieren resistencia al metilviológeno mediante sistemas detoxificadores, impermeabilización de membranas, etc. (Morimyo, 1988; Morimyo *et al.*, 1992; Hongo *et al.*, 1994; Yerushalmi *et al.*, 1995; Won *et al.*, 2001).

En ambos casos, la obtención de bacterias de interés agronómico como *Sinorhizobium meliloti* y *Pseudomonas fluorescens* con un aumento en la tolerancia a estos herbicidas representa una importante alternativa. Podría ser de gran interés su aplicación como bioinoculantes para la utilización y recuperación de suelos contaminados con estos herbicidas. Si bien existen numerosos ejemplos de bacterias de interés agronómico, capaces de degradar determinados compuestos, la obtención de una

mayor tolerancia al estrés oxidativo en términos generales, puede suponer una protección más amplia frente las diferentes alteraciones y estreses ambientales que conllevan un estrés oxidativo. Además, existe la posibilidad de transformar con el gen de la flavodoxina aquellas bacterias autóctonas de interés agrícola de un suelo determinado, para permitir su utilización como bioinoculantes en cultivos tratados con herbicidas.

### 3. Efecto de la expresión de flavodoxina en bacteroides sobre el proceso de senescencia natural de los nódulos de *Medicago sativa*

Dado que las plantas conviven con multitud de microorganismos, han desarrollado mecanismos que les permiten identificar los patógenos e iniciar reacciones defensivas. Las plantas poseen toda una batería de mecanismos defensivos y entre ellos, la generación y acumulación de especies reactivas de oxígeno es una respuesta defensiva muy común (Huckelhoven y Kogel, 2003).

En el caso de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa, si bien algunas etapas recuerdan a las interacciones planta-patógeno, el complejo diálogo de intercambio de señales químicas entre los simbioses regula las reacciones de defensa de la planta posibilitando la interacción y el establecimiento de la simbiosis (Djordjevic *et al.*, 1987; Mckhann y Hirsch, 1994; Baron y Zambryski, 1995; Mithofer, 2002). En las interacciones compatibles, se ha visto que el intercambio de señales y fundamentalmente la presencia de determinados lipopolisacaridos son suficientes para suprimir la mayor parte del “burst” oxidativo (Niehaus y Becker, 1998; Scheidle *et al.*, 2005). Se ha descrito como los factores Nod de los rizobios, pueden inhibir el flujo de ROS procedente de los tejidos radiculares de la leguminosa (Shaw y Long, 2003). Además es necesario considerar el papel de las especies reactivas de oxígeno y en particular del  $H_2O_2$ , como moléculas mensajeras en la cascada señalizadora que conduce a la formación de los nódulos (D’Haeze *et al.*, 2003; Herouart *et al.*, 2002). De hecho, los factores Nod, pueden inducir la producción de  $H_2O_2$ , como molécula señal para la expresión de algunas nodulinas (Ramu *et al.*, 2000).

Durante los primeros días del desarrollo del nódulo de soja, se ha descrito la existencia de daño a las proteínas y al ADN como probable consecuencia de un estrés oxidativo procedente del establecimiento de la simbiosis (Evans *et al.*, 1999). Así, Santos *et al.* (2001) han descrito la producción de ROS tales como peróxido de



hidrógeno e ión superóxido en los canales de infección. Existen incluso evidencias, de la presencia de especies reactivas de nitrógeno, como el óxido nítrico, en nódulos jóvenes de alfalfa (Hérouart *et al.*, 2002). En casos más extremos, las respuestas defensivas son capaces de producir el aborto del proceso infectivo (Vasse *et al.*, 1993). El colapso de los canales de infección se ha correlacionado con la presencia de  $H_2O_2$  a través del control de la fluidez de la matriz de glicoproteínas que rodea a las bacterias en el canal de infección (Wisniewski *et al.*, 2000).

Para contrarrestar estas respuestas defensivas, las rizobacterias cuentan con toda una serie de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos (Becana *et al.*, 2000; Herouart *et al.*, 2002; Matamoros *et al.*, 2003). La disfunción de algunos de ellos reduce enormemente la capacidad de nodulación, así como la diferenciación de los bacteroides y la capacidad fijadora de nitrógeno (Santos *et al.*, 2000; Sigaud *et al.*, 1999; Jamet *et al.*, 2003; Harrison *et al.*, 2005; Dombrech *et al.*, 2005).

En los ensayos de nodulación de las plantas de *Medicago sativa* con los diferentes inóculos, no se observaron diferencias significativas en el número de nódulos formados. La expresión de la flavodoxina en las bacterias de *Sinorhizobium meliloti* no tuvo efecto sobre el número de nódulos formados, ni la dinámica de la nodulación. Así pues, la presencia de la proteína aparentemente no altera o desestabiliza los sistemas antioxidantes de la bacteria durante la organogénesis del nódulo. La alteración de estos sistemas puede inhibir o retrasar la formación de los nódulos (Santos *et al.*, 2000; Harrison *et al.*, 2005). A los 10 dpi, cuando ya se han formado o han comenzado a desarrollarse el 80-90 % de los nódulos, la fijación de nitrógeno de las plantas de *Medicago sativa* inoculadas con bacterias de *Sinorhizobium meliloti* que expresan flavodoxina fue superior (30%) pero de forma no significativa. El estudio de algunos parámetros de daño oxidativo y niveles de ROS y antioxidantes, podría dilucidar si la flavodoxina tiene algún efecto sobre el estrés oxidativo descrito en las primeras etapas de la formación del nódulo (Evans *et al.*, 1999; Santos *et al.*, 2001; Hérouart *et al.*, 2002) y sus posibles consecuencias en la capacidad fijadora de nitrógeno inicial.

Además, resultaría imprescindible contrastar la competitividad de nuestras bacterias, frente a las poblaciones naturales del suelo. En este sentido, se han aislado y descrito, multitud de cepas de laboratorio con elevada capacidad infectiva, de nodulación y de fijación de nitrógeno, que en condiciones naturales, no incrementaban la producción agrícola debido a su escasa competencia con las poblaciones microbianas naturales (Dowling y Broughton, 1986; Streeter, 1995; Toro, 1996; Tripplet y

Sadowsky, 1992). No obstante, existen otros ejemplos en los que la modificación genética de cepas, consigue aumentar su competitividad (Robleto *et al.*, 1997, 1998; Van Dillewijn *et al.*, 2001).

En nuestras condiciones de cultivo, el máximo de fijación de nitrógeno estimada como actividad nitrogenasa por gramo de nódulo fresco, se situó entre los 18 y 22 dpi. Hasta los 25 dpi no hubo diferencias significativas en la capacidad fijadora de nitrógeno entre inóculos. La expresión de flavodoxina en los bacteroides no parece tener efecto sobre la actividad nitrogenasa hasta los 28 dpi, en el que se observa un efecto positivo, que se mantiene incluso hasta los 44 dpi. A partir de los 25 dpi y hasta los 44 dpi estudiados, hubo un descenso en la actividad nitrogenasa de los nódulos. La evolución de la actividad fijadora de nitrógeno ha sido objeto de estudio en diferentes leguminosas. Algunos autores correlacionan el descenso de la fijación de nitrógeno con la floración o la fructificación (Vessey *et al.*, 1990; Vilkman y Vessey, 1992; Swaraj *et al.*, 1995) y en otros casos consideran que esta caída es independiente del periodo reproductivo (Hernández-Jiménez, 1998).

En los nódulos control, la caída es más o menos constante ( $R^2=0,97$ ) con una pendiente  $m=-5300$  mientras que en los nódulos cuyos bacteroides expresan flavodoxina, hay una primera fase (25-32 dpi) donde la caída en la actividad nitrogenasa no es significativa ( $m=-3400$ ) y una segunda fase ( $R^2=0,99$ ) con una pendiente similar a la de los nódulos control ( $m=-5900$ ). Parece por tanto que hasta los 32 dpi, no se produce el típico descenso en la actividad nitrogenasa descrito en los nódulos control desde los 25 dpi. Las diferencias significativas en la capacidad fijadora de nitrógeno entre los nódulos control y los nódulos donde se expresa la flavodoxina probablemente sean debidas a un retraso en el proceso de senescencia. No obstante, estas diferencias no se han traducido en variaciones en la cantidad de biomasa de las plantas durante los dpi estudiados. A largo plazo, quizás podrían manifestarse diferencias en algunos parámetros morfométricos o en el propio contenido de nitrógeno de las plantas. Por otra parte, debido al elevado coste del proceso fijador de nitrógeno, sería lícito pensar en el efecto negativo que podría tener la prolongación del proceso durante el retardo de la senescencia, en el resto de los procesos que tienen lugar en la planta, y en especial en la fructificación y producción de semillas. Hasta hoy, todos los experimentos en este sentido sugieren que la prolongación del proceso de fijación nitrógeno no tendría efectos negativos sobre el periodo reproductivo (Imsande y Ralston, 1982; Riggle *et al.*,



1982) y si un efecto positivo en la producción de biomasa en general incluida la producción de semillas (Puppo *et al.*, 2005).

Si bien existen numerosos mutantes que afectan a distintos procesos o etapas de la simbiosis, hasta ahora no se ha descrito ningún fenotipo con senescencia retardada (Puppo *et al.*, 2005), ni se dispone de muchos datos sobre el control genético del proceso (Fedorova *et al.*, 2002). La manipulación del proceso de senescencia para retardar su aparición o aliviar sus efectos, tiene un gran interés agronómico además de la importancia científica intrínseca del conocimiento del proceso. Puppo *et al.* (2005) sugieren algunos abordajes para la manipulación de la senescencia del nódulo: Alteración de la transducción de la señal de senescencia tallo-raíz, utilización de genes clave en el control del proceso, inhibición y alivio del estrés oxidativo ó incremento de la competitividad y eficiencia de los rizobios. La modificación de las señales, el bloqueo de la transducción de la señal o la propia inhibición de las repuestas generadas en el inicio del proceso de senescencia natural o inducida, aparentemente no representarían mecanismos factibles para mantener el sistema simbiótico con garantías de incrementar la producción. El mantenimiento de la actividad fijadora en condiciones subóptimas podría llevar asociados efectos deletéreos con consecuencias más drásticas para la asociación simbiótica. Sin embargo, la prolongación de la vida útil del nódulo mediante la mejora de los sistemas de detoxificación, o la efectividad del complejo nitrogenasa, representan abordajes más validos para incrementar la producción.

La expresión de flavodoxina podría aumentar la efectividad del complejo nitrogenasa debido a la capacidad para transferir electrones en una gran variedad de procesos metabólicos. La fijación biológica del nitrógeno catalizada por la nitrogenasa representa un proceso muy costoso con un consumo mínimo estimado de 16 moléculas de ATP y 8 equivalentes reductores de bajo potencial (aprox. -450 mV) por molécula de nitrógeno reducida. En condiciones fisiológicas normales la provisión del poder reductor para la nitrogenasa está mediada por la ferredoxina y la flavodoxina y procede de la oxidación de diferentes sustratos en función de la fisiología del microorganismo. En diferentes tipos de ferredoxinas ([2Fe-2S], [3Fe-3S] y [4Fe-4S]), aisladas de bacterias fijadoras de nitrógeno, se ha descrito la capacidad *in vitro* de donar o transferir los electrones a la nitrogenasa (Yoch y Arnon, 1975; Jouanneau *et al.*, 1990; Schrautemeier y Böhme, 1992; Yakunin *et al.*, 1993). Además, en el caso de *Klebsiella pneumoniae* se ha establecido la transferencia de electrones desde el ácido pirúvico hasta la nitrogenasa mediante la flavodoxina (NifF) y la enzima piruvato-flavodoxina

oxidoreductasa (POR, EC: 1.2.7.1; NifJ) (Shah *et al.*, 1983; Deistung *et al.*, 1985). Más recientemente se ha visto que esta misma ruta NifJ-NifF de transporte de electrones a la nitrogenasa, puede ser operativa en *Rhodobacter capsulatus* (Gennaro *et al.*, 1996; Hallenbeck y Gennaro, 1998; Yakunin y Hallenbeck, 1998). En condiciones anaeróbicas, el ácido pirúvico puede ser catabolizado por la POR para la reducción de la flavodoxina en presencia de piruvato y coenzima A (CoA) con la producción de CO<sub>2</sub> y acetil-CoA. Aunque esta enzima ha sido descrita y aislada en multitud de organismos (incluidos eucariotas, eubacterias y arqueobacterias) poco se conoce sobre su ciclo catalítico y su interacción con la flavodoxina o la ferredoxina (Yakunin y Hallenbeck, 1998). Un estudio más detallado del complejo nitrogenasa, del suministro de poder reductor y de las fuentes del mismo, en los nódulos que expresan la flavodoxina podrían esclarecer si la expresión de la flavodoxina mejora la eficiencia del sistema fijador de nitrógeno y cual es su modo de actuación. No obstante no parece que así sea dado que nuestros resultados indican que no hubo diferencias significativas en los valores máximos de fijación.

Por otra parte, la expresión de flavodoxina en los nódulos, podría constituir una mejora de los sistemas de detoxificación debido a la elevada capacidad para reaccionar con especies altamente oxidantes y la facilidad para ser reciclada con una fuente de electrones adecuada.

Durante la senescencia natural, el descenso en la actividad nitrogenasa ocurre en paralelo al descenso en leghemoglobina (Pladys y Rigaud, 1985; Dalton *et al.*, 1986; Lahiri *et al.*, 1993) y/o al incremento en la cantidad de hierro catalítico (Swaraj y Bishnoi, 1996; Hernández-Jiménez *et al.*, 2002). Del mismo modo, desde la maduración del nódulo se produce una disminución en la cantidad de glutatión y ascorbato así como un descenso en algunas actividades enzimáticas del metabolismo oxidativo (Evans *et al.*, 1999; Matamoros *et al.*, 1999b; Becana *et al.*, 2000; Hernández-Jiménez *et al.*, 2002; Puppo *et al.*, 2005; Groten *et al.*, 2005).

La superóxido dismutasa (SOD) representa la primera línea de defensa contra ROS. Mutantes de *Sinorhizobium* defectivos en SOD producen, entre otras alteraciones, la senescencia prematura de los nódulos (Santos *et al.*, 2000). Hernández-Jiménez *et al.* (2002) observaron un aumento de la actividad SOD durante la senescencia natural del nódulo de lupino. Sin embargo, en nódulos de judía, no se apreciaron variaciones significativas (Swaraj *et al.*, 1995). En los nódulos de alfalfa, observamos un aumento



significativo en la actividad SOD entre los 18 y 44 dpi. La expresión de flavodoxina en los nódulos no tiene un efecto apreciable sobre la actividad SOD.

Las diferentes isoenzimas de la catalasa (CAT) de *Sinorhizobium meliloti* muestran una expresión diferencial durante la formación y el desarrollo del nódulo (Jamet *et al.*, 2003). A diferencia de los mutantes simples, en los nódulos formados por el doble mutante *katA katC* se observa un drástico descenso en la capacidad fijadora de nitrógeno de los nódulos de alfalfa (Sigaud *et al.*, 1999). Por su parte, las bacterias mutantes *katB katC* no se diferencian a bacteroides y se produce una senescencia prematura del nódulo (Jamet *et al.*, 2003). En nódulos de lupino, Hernández-Jiménez *et al.* (2002), observaron un descenso en la actividad de la tres isoenzimas de la CAT y la actividad total descendió un 88% en nódulos senescentes de 9 semanas. Del mismo modo se han descrito descensos significativos de la actividad CAT en nódulos senescentes de *Cajanus cajan* (Swaraj *et al.*, 1995), *Cicer arietinum* (Sheokand y Swaraj, 1996) y *Pisum sativum* (Groten *et al.*, 2005). En los nódulos de alfalfa, se observó un descenso significativo en la actividad CAT entre los 32 y 44 dpi. A los 44 dpi, la actividad CAT es significativamente mayor en los nódulos control. Quizás esto pudiera deberse al retraso en el desequilibrio entre ROS y los sistemas antioxidantes (efecto de desbordamiento).

El ácido ascórbico y el glutathion son los tamponadores redox más importantes en la célula (Noctor y Foyer, 1998) y los principales antioxidantes en el nódulo de las leguminosas (Becana *et al.*, 2000; Matamoros *et al.*, 2003). Existen multitud de trabajos que subrayan la importancia del ciclo ascorbato – glutathion y de sus componentes para el funcionamiento del nódulo (Bashor y Dalton, 1999; Ross *et al.*, 1999; Frendo *et al.*, 2005; Harrison *et al.*, 2005). De hecho, la actividad de las enzimas del ciclo ascorbato-glutathion es mucho mas elevada (de 2 a 36 veces) en los nódulos que en las raíces no infectadas y la actividad de estas enzimas y el contenido de GSH es mucho mayor (de 1,5 a 5,5 veces) en los nódulos efectivos que en los nódulos no efectivos (Matamoros *et al.*, 2003). No obstante, algunos trabajos recientes en senescencia natural de nódulos les un papel regulador y señalizador además de la función antioxidante hasta ahora admitida (Puppo *et al.*, 2005; Groten *et al.*, 2005). Por tanto, las variaciones observadas en el contenido de estos antioxidantes durante el desarrollo del nódulo y en la senescencia podrían formar parte del control de la transducción de la señal de senescencia como se ha descrito en hojas (Kindle *et al.*, 2003; Pastori *et al.*, 2003),

además de constituir un mecanismo fundamental para disminuir el estrés oxidativo. Ambas funciones podrían ser no excluyentes.

Si bien las enzimas para la síntesis del glutathione han sido identificadas y caracterizadas en nódulos (Dalton *et al.*, 1986; 1993a; Matamoros *et al.*, 1999b; Frendo *et al.*, 2001), poco se conoce sobre la síntesis *de novo* del ácido ascórbico en los nódulos. En estudios de nódulos de guisante, no se ha detectado la última enzima implicada en la principal ruta de síntesis del ácido ascórbico (GalLDH) ni se produce la síntesis *de novo* con la infiltración ó incubación de los sustratos de la reacción (Groten *et al.*, 2005). Existen evidencias del transporte de ascorbato a través del floema desde las hojas a las raíces (Franceschi y Tarlyn, 2002). Groten *et al.* (2005) sugieren la importación de este soluto desde la raíz mediante el sistema vascular.

Durante la senescencia natural de nódulos de lupino, Hernández-Jiménez *et al.* (2002), observaron un descenso de las actividades APX, MDHAR, y DHAR y un incremento en la actividad GR, fundamentalmente en estados de avanzada senescencia. Igualmente, detectaron elevados niveles de GSH y GSSG en nódulos con alto grado de senescencia y un declive del balance redox de glutathione (GSH/GSSG). Por el contrario en nódulos de guisante, Groten *et al.* (2005) observaron un incremento de la actividad MDHAR frente al descenso de las actividades APX y DHAR. El contenido de ascorbato y glutathione total descendió y la actividad GR y el balance redox permanecieron más o menos constante (Groten *et al.*, 2005). En nódulos senescentes de soja, observaron un descenso de ascorbato y glutathione total y un deterioro del balance redox del glutathione (Evans *et al.*, 1999).

En este trabajo, comprobamos un descenso de las actividades APX, MDHAR, y DHAR y un incremento de la actividad GR. Con la edad de los nódulos de alfalfa, el contenido de GSH y GSSG aumentó y se observó un deterioro del balance redox de glutathione. Las actividades APX, DHAR y GR y el balance redox de glutathione son mayores en los nódulos donde se expresa la flavodoxina, fundamentalmente a los 32 dpi. La actividad APX protege del  $H_2O_2$  a la leghemoglobina y a otras proteínas sensibles a ROS. Además, en el parénquima, concretamente a unas pocas células del tejido infectado, la APX probablemente participa en la operatividad de la barrera de difusión al oxígeno modulando la concentración de  $H_2O_2$  como molécula señal para la apertura y cierre de la barrera de difusión al oxígeno (Dalton *et al.*, 1998; Matamoros *et al.*, 2003). Por otra parte, aunque el reciclado de los niveles de ascorbato puede ser llevado a cabo tanto por la MDHAR como la DHAR, los niveles de MDHAR en el



citosol de las células del nódulo son muy bajos (Dalton *et al.*, 1993a) por lo que el reciclado está fundamentalmente acoplado a la actividad DHAR. Se ha sugerido que la actividad MDHAR participa principalmente en la regeneración de los niveles de AsA en el espacio apoplástico, en la síntesis de proteínas ricas en hydroxiprolina, y en la lignificación de la pared celular (Matamoros *et al.*, 2003).

La determinación de los niveles de ácido ascórbico y dehidroascórbico contribuirá a la discusión del posible efecto de la expresión de la flavodoxina sobre el ciclo ascorbato-glutation o sobre la situación fisiológica del nódulo y en consecuencia de la señalización de la misma. No obstante, con los datos actuales, aparentemente la flavodoxina podría tener efecto sobre la actividad detoxificadora del ascorbato (AsA *per se* y APX) y sobre la regeneración de sus niveles vía DHAR y GR mediante el GSH. El aumento de la eficiencia o el retraso del declive del ciclo ascorbato-glutation ó de alguno de sus componentes, representa un importante incremento en la capacidad antioxidante del nódulo y una considerable ayuda al mantenimiento de la barrera de difusión al oxígeno (Becana *et al.*, 2000). Sin embargo, los niveles y actividades detectados en nuestro trabajo podrían ser consecuencia más que causa del retraso del periodo de senescencia estimado hasta los 32 dpi en los nódulos donde se expresa la flavodoxina, debido a una mayor eficiencia del sistema fijador de nitrógeno. La estimación de parámetros de daño oxidativo a biomoléculas (peroxidación de lípidos, oxidación de grupos carbonilos de proteínas y fragmentación de ADN) y la determinación del contenido de leghemoglobina e hierro catalítico aportarán datos más clarificadores sobre el posible efecto antioxidante de la flavodoxina.

En el metabolismo carbonado de los nódulos, las actividades SS y PEPc resultan esenciales para la fijación de nitrógeno (Gordon *et al.*, 1995, 1999; King *et al.*, 1986; Rosendhal *et al.*, 1990). La actividad SS, además de aprovisionar de esqueletos carbonados al nódulo para el mantenimiento de la actividad fijadora de nitrógeno, representa un control o regulación del metabolismo carbonado y de la fijación de nitrógeno (Gordon *et al.*, 1997). A partir del CO<sub>2</sub> respirado en los nódulos, la actividad PEPc proporciona oxalacetato para ser utilizado en las mitocondrias en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, importarse a los bacteroides en forma de malato, vía MDH, o sufrir una transaminación para producir aspartato, vía AAT. Su expresión esta regulada por la cantidad de fotosíntatos transportados y su activación depende de la fosforilación de ciertos residuos (Nakagawa *et al.*, 2003).

Aunque existen multitud de trabajos sobre las variaciones de SS y PEPc en nódulos sometidos a diferentes estreses, no hay muchos datos de las actividades de estas enzimas durante la senescencia natural. En nódulos de alfalfa, Trepp *et al.* (1999) localizaron la expresión de SS en la Z<sub>I</sub>, Z<sub>II-III</sub> y Z<sub>III</sub> (19 y 33dpi) y Z<sub>II</sub> (33 dpi) y la expresión de PEPc en la Z<sub>II</sub>, Z<sub>II-III</sub> (19 y 33 dpi) y Z<sub>III</sub> (19 dpi). En nódulos de guisante, se observó un incremento de la actividad PEPc durante el desarrollo y senescencia del nódulo (Suganuma *et al.*, 1997).

En los nódulos de alfalfa, observamos un incremento significativo en la actividad SS y PEPc entre los 32 y 44 dpi. En los nódulos que expresan flavodoxina, las actividades SS y PEPc son mayores aunque no de forma significativa. Aparentemente, la actividad de estas enzimas no es responsable de las diferencias observadas en la capacidad de fijar nitrógeno de los diferentes nódulos.

Durante el proceso de senescencia del nódulo, tienen lugar una serie de alteraciones estructurales y ultraestructurales (Vance *et al.*, 1980; Pladys y Rigaud, 1985; Puppo *et al.*, 1991; Swaraj y Bishnoi, 1996; Lucas *et al.*, 1998; Matamoros *et al.*, 1999; Hernández-Jiménez *et al.*, 2002; Puppo *et al.*, 2005). Existen algunas diferencias fundamentalmente en función del tipo de nódulo y del origen del envejecimiento (natural o inducido por estrés). En los nódulos control de alfalfa, a partir de los 30 dpi comenzó a desarrollarse la Z<sub>IV</sub> y se observaron las típicas alteraciones en los bacteroides y orgánulos subcelulares. Algunos autores consideran que la membrana del simbiosoma es una de las primeras dianas en la degradación del simbiosoma en nódulos de alfalfa y judía (Pladys y Rigaud, 1985; Puppo *et al.*, 1991). Por el contrario, en los nódulos control de alfalfa, observamos fusiones de los simbiosomas quedando varios bacteroides muy deteriorados e incluso colapsados, rodeados por una membrana peribacteroidal común aparentemente inalterada. No obstante, a pesar de la inapreciable degradación de la misma, la probable alteración de sus componentes de señalización y transporte conlleve drásticas consecuencias fisiológicas para la simbiosis. En los nódulos de lupino, solo se observa la degradación de la membrana peribacteroidal en estadios senescentes muy avanzados (Hernández-Jiménez *et al.*, 2002).

Los nódulos de alfalfa que expresan la flavodoxina en los bacteroides de *Sinorhizobium meliloti*, mostraron algunas variaciones con respecto a las características típicas de la senescencia de los nódulos. Fundamentalmente, en los nódulos de 44 dpi se observó una menor extensión de la Z<sub>IV</sub> y menor alteración de los simbiosomas. Además destacó la especial acumulación de amiloplastos con enormes granos de almidón en las



$Z_{III}$  y  $Z_{IV}$  y una mayor presencia de cristales de ferritina en los plastidios de las células intersticiales de la  $Z_{III}$ .

El supuesto retraso del inicio de la senescencia, en los nódulos que expresan flavodoxina, sugerido a partir de los datos de la actividad nitrogenasa, coincide con el análisis de la estructura y ultraestructura de estos nódulos. El mantenimiento funcional de la zona de fijación podría explicar las diferencias en las tasas de fijación de nitrógeno.

Existen numerosos trabajos que subrayan la importancia antioxidante de la ferritina como proteína almacenadora del hierro libre debido a la elevada concentración de este elemento en los nódulos de las leguminosas y su capacidad para generar radicales  $\cdot OH$  (Ko *et al.*, 1987; Tang, 1990a; Lucas *et al.*, 1998; Matamoros *et al.*, 1999a; Hernández-Jiménez *et al.*, 2002). En nódulos de soja, se han estudiado los niveles de ferritina (ARNm y proteína) y su regulación postranscripcional (Ragland y Theil, 1993; Kimata y Theil, 1994). En estos nódulos, existe un incremento de ferritina en el comienzo del desarrollo del nódulo y un posterior descenso que coincide con el aumento en los niveles y actividad del complejo nitrogenasa y de la proteína leghemoglobina (Ragland y Theil, 1993). Lucas *et al.* (1998) vieron una mayor inmunolocalización de ferritina en los plastidios y amiloplastos de las células infectadas e intersticiales de las  $Z_{II}$ ,  $Z_{II-III}$  y  $Z_{III}$  en nódulos de alfalfa con respecto a la  $Z_{IV}$ . Además, durante la senescencia en nódulos de lupino, observaron un aumento en la cantidad de ferritina debido fundamentalmente a la ferritina localizada en las células del cortex interno. La formación del nódulo y las primeras etapas de su desarrollo están limitadas por deficiencias en los niveles de hierro (O'Hara *et al.*, 1988; Tang *et al.*, 1990b) y están acopladas al aumento en la captación radicular de hierro, la translocación hasta el nódulo y su posterior almacenamiento mediante la ferritina (Terry *et al.*, 1991; Ko *et al.*, 1987).

El incremento de ferritina en plastidios de las células intersticiales de la  $Z_{III}$  de los nódulos de alfalfa formados por los bacteroides que expresan la flavodoxina, constituiría un refuerzo preventivo de los mecanismos antioxidantes. De hecho, debido a la capacidad de la ferritina para reducir los niveles de hierro libre y así evitar daños oxidativos de las subsecuentes especies reactivas de oxígeno, se ha descrito como la expresión ectópica de la ferritina de alfalfa en plantas transgénicas de tabaco conlleva un aumento en la tolerancia a diferentes patógenos y al estrés oxidativo directo generado por exceso de hierro y tratamiento con metilviológeno (Deak *et al.*, 1999).

La expresión de ferritina puede inducirse por la presencia de  $H_2O_2$  y de elevados niveles de hierro catalítico (Briat *et al.*, 1999; Wei y Theil, 2000). Para interpretar el efecto de la flavodoxina sobre el aumento de la presencia de ferritina descrito, sería importante analizar el contenido de hierro libre y  $H_2O_2$  así como determinar la cantidad de ferritina y relacionarla con los niveles de nitrogenasa y leghemoglobina. No obstante con los datos actuales, no parece que el aumento de la presencia de ferritina proceda de un estado redox más desfavorable, si no más bien, de un retraso en la senescencia del nódulo y por tanto un estadio metabolitamente más activo en el que es necesario que se induzca la captación y translocación de más hierro hasta el nódulo.

La acumulación atípica de almidón ha sido descrita y asociada a diferentes tipos de nódulos. Por ejemplo, nódulos indeterminados formados por bacteroides mutantes del sistema de transporte de ácidos dicarboxílicos (*dctA*), presentan una senescencia prematura, con una extensa  $Z_{IV}$  y una gran acumulación de almidón (Ronson *et al.*, 1981; Finan *et al.*, 1983; Arwas *et al.*, 1985; Watson *et al.*, 1988). Del mismo modo, nódulos de guisantes formados por bacteroides mutantes de la enzima aspartato aminotransferasa (*aatA*) o de los sistemas de importación y exportación de aminoácidos a través de la membrana del bacteroide (*aap/bra*) tienen una acumulación excesiva de almidón (Lodwig *et al.*, 2003). También, los nódulos de alfalfa formados por bacteroides mutantes en la síntesis del glutatión (*gshB*), acumulan un producto intermediario ( $\gamma$ -glutamilcisteína) y tienen una capacidad reducida de fijar el nitrógeno. Estos nódulos exhiben un desarrollo anormal, donde destaca una importante acumulación de almidón (Harrison *et al.*, 2005). Existen muchos ejemplos de nódulos afectados por diferentes mutaciones que igualmente presentan patrones anormales en la acumulación de almidón (Muller *et al.*, 1995; Green y Emerich, 1997; Lotocka *et al.*, 1998; Romanov *et al.*, 1998; Tansengco *et al.*, 2003). En todos ellos, existe un denominador común: los nódulos tienen anulada ( $Fix^-$ ) o muy disminuida la capacidad de fijar nitrógeno. Los bacteroides no se han diferenciado o existe un bloqueo en su metabolismo a diferentes puntos: importación ó procesamiento de los esqueletos carbonados, deficiencias en el ciclo de los aminoácidos, sobrecarga oxidativa por déficit de antioxidantes, etc. Normalmente hay una alteración de las enzimas del metabolismo carbonado y fundamentalmente descienden las actividades SS y PEPc. Los fotosintatos que recibe el nódulo a través del floema no son consumidos por los simbiosomas y se acumulan en forma de almidón. En el desarrollo normal de un nódulo, en la  $Z_{III}$ , los simbiosomas consumen el almidón que se acumuló en la  $Z_{II-III}$  (Forrest *et al.*, 1991), y



solo el exceso de los fotosintatos recibidos es almacenado en forma de almidón (Thummler y Verma, 1987). Forrest *et al.* (1991) estudiaron la actividad de las enzimas del metabolismo del almidón en nódulos efectivos e inefectivos de soja, y describieron un incremento de la actividad almidón sintasa (EC 2.4.1.21) y  $\alpha$ -amilasa (EC 3.2.1.1) en los nódulos inefectivos que acumulaban grandes cantidades de almidón.

A diferencia de los nódulos inefectivos con patrones anormales en la acumulación de almidón, los nódulos de alfalfa formados por los bacteroides que expresan la flavodoxina, presentan un desarrollo típico y una diferenciación de los bacteroides normal. Además exhiben una capacidad fijadora de nitrógeno superior a los nódulos control por lo que no existe ningún bloqueo metabólico en los bacteroides. El posible efecto de la flavodoxina como mejora de los sistemas de detoxificación o aumento de la eficiencia del sistema fijador, aparentemente no conlleva ninguna variación en la demanda de fotosintatos dado que las actividades SS y PEPc no están afectadas. Sin embargo, la acumulación anormal de almidón podría ser interpretada como un aumento del suministro de fotosintatos al nódulo (en su concepción más simbiótica) como respuesta a: 1) la tasa de fijación de nitrógeno; 2) la eficiencia del sistema fijador; 3) la bonanza redox del bacteroide. Podría igualmente suceder que la planta no estuviera recibiendo ese nitrógeno fijado y por ello aumentara el suministro de fotosintatos. Esta última posibilidad resulta bastante improbable debido al aspecto saludable de las plantas y a los parámetros morfométricos correctos.

Además, un mayor suministro de fotosintatos desde las hojas hasta el nódulo a través del floema podría explicar igualmente la mayor presencia de almidón observada en las células corticales y de transferencia de la raíz y en las células del cortex interno próximas a los haces vasculares del nódulo.

La determinación de las actividades enzimáticas del metabolismo del almidón, la cantidad de nitrógeno asimilado en las plantas y las cantidades y tasas de fotosintatos suministrados al nódulo, podría dilucidar las diferentes hipótesis sobre la excesiva acumulación de almidón en estos nódulos.

#### **4. Efecto de la expresión de flavodoxina en bacteroides de nódulos de plantas de *Medicago sativa* sometidas a estrés salino**

El estrés salino constituye uno de los principales estreses ambientales que afectan a la producción de las leguminosas en las regiones áridas y semiáridas, debido

fundamentalmente a la dependencia de las leguminosas del nitrógeno fijado mediante su simbiosis con *Rhizobium* (El Sheik y Wood, 1995).

Los niveles de salinidad que inhiben la simbiosis entre leguminosas y rizobacterias difieren de aquellos que alteran el crecimiento de cada uno de los simbioses por separado (Rao *et al.*, 1972; Lauter *et al.*, 1981). En este sentido, las concentraciones que afectan la simbiosis entre *Medicago sativa* y *Sinorhizobium meliloti* son inferiores a las concentraciones que afectan el crecimiento y la supervivencia individual (Mohammad *et al.*, 1989). En general, las leguminosas son más sensibles que los rizobios (Lauter *et al.*, 1981; Singleton *et al.*, 1982; Singleton y Bohlool, 1983; Wilson, 1985; Sprent y Zahran, 1988). Dentro de ellas, existen especies muy sensibles a la salinidad y otras más tolerantes. Tradicionalmente, *Medicago sativa* ha sido incluida dentro de las leguminosas parcialmente tolerantes a la salinidad (Smith *et al.*, 1981; Sherrel, 1983; Abdel-Wahab y Zahran, 1983; Mohammad *et al.*, 1989). Los rizobios pueden sobrevivir en presencia de elevadas concentraciones de sal, tanto en cultivo (Abdel-Wahab y Zahran, 1979; Hamdi y Al Tai, 1981; Busse y Bottomley, 1989; El Shinnawi *et al.*, 1989; El Sheik y Wood, 1989a, 1989b, 1990), como en el suelo (Yadav y Vyas, 1971; Bhardwaj, 1975; Douka *et al.*, 1978). *Sinorhizobium meliloti* sobrevive en concentraciones de NaCl entre 300 y 700 mM (Embalomatis *et al.*, 1994; Helemish *et al.*, 1991; Mohammad *et al.*, 1991; Sauvage *et al.*, 1983). En este sentido, se han descrito adaptaciones de los rizobios a los ambientes salinos a través de variaciones en sus lipopolisacáridos (Lloret *et al.*, 1995). La escasa eficiencia simbiótica de algunas leguminosas crecidas en condiciones de salinidad no es debida a las limitaciones en el crecimiento de las rizobacterias. Existen numerosos trabajos que subrayan una mayor sensibilidad a la salinidad de las leguminosas que dependen del nitrógeno fijado frente a aquellas que dependen del nitrógeno mineral (Youssef y Sprent, 1983; Lauter *et al.*, 1981; Serraj y Drevon, 1998; Boughmouch *et al.*, 2005).

El estrés salino reduce la nodulación de las leguminosas como consecuencia de la inhibición de determinados eventos simbióticos tales como la colonización del pelo radicular y la propia infección (Lakshmi-Kumari *et al.*, 1974; Tu, 1981; Singleton y Bohlool, 1984; Zahran, 1986; Zahran y Sprent, 1986; Sprent y Zahran, 1988; Boughmouch *et al.*, 2005). La modificación del contenido de algunos nutrientes minerales como consecuencia del estrés salino, parece tener especial relevancia en la inhibición de estos eventos, dado que la recuperación de los niveles incrementa la tolerancia de la simbiosis al estrés salino (El-Hamdaoui *et al.*, 2003a, 2003b).



El estudio de las interacciones *Rhizobium*-leguminosa propias de los ecosistemas áridos constituye una importante línea o estrategia para aumentar la productividad de las plantas de manera sostenible, en las áreas susceptibles de sufrir un incremento en la salinidad de sus suelos (Zahran, 1991b). Además del aprovechamiento de la variabilidad genética natural, la construcción de nuevas cepas modificadas genéticamente abre un amplio abanico de posibilidades para el aprovechamiento de los suelos salinos.

En las plantas de *Medicago sativa* inoculadas con *Sinorhizobium meliloti* en presencia de NaCl (10-25-50-100 mM), se observó una reducción similar en el número y en la dinámica de formación de los nódulos con los diferentes inóculos. Aparentemente, la expresión de flavodoxina en las bacterias de *Sinorhizobium meliloti* no tiene un efecto apreciable sobre la nodulación en ninguna de las condiciones ensayadas del estrés salino. Además, la expresión de flavodoxina en las bacterias sometidas a estrés salino en vida libre, tampoco supuso un aumento de la tolerancia al estrés salino (datos no mostrados).

Además de los procesos de nodulación y del crecimiento y desarrollo del nódulo, la salinidad afecta especialmente a la actividad del nódulo. Los nódulos que se han desarrollado eficientemente en presencia de sal, parecen ser mas tolerantes a la salinidad que aquellos que se han desarrollado previamente a la imposición del estrés salino (Zahran, 1986). Se han propuesto varias hipótesis sobre el efecto de la salinidad en el proceso de fijación de nitrógeno en las leguminosas: 1) reducción en el suministro de fotosíntatos al nódulo (Bekki *et al.*, 1987); 2) reducción en el suministro de esqueletos carbonados para la respiración de los bacteroides (Delgado *et al.*, 1993, 1994; Gordon *et al.*, 1997; González *et al.*, 2001) y 3) alteraciones estructurales y modificaciones en la barrera de difusión al oxígeno (Serraj *et al.*, 1994).

Nuestros resultados indican una reducción significativa en la fijación de nitrógeno de los nódulos control de las plantas de *Medicago sativa* por efecto del tratamiento salino (100 mM NaCl) durante 2 (40%), 3 (60%) y 4 días (73%). Del mismo modo, observamos una disminución significativa en el peso seco de las plantas en los tratamientos de 3 y 4 días de duración. Si bien la intensidad, duración y momento de aplicación del estrés, junto con el sistema y condiciones de crecimiento de las plantas parecen ser factores fundamentales que influyen en los efectos del estrés salino en las principales leguminosas estudiadas, se han descrito por otros autores reducciones similares en la capacidad de fijación de nitrógeno y en la producción de biomasa (Delgado *et al.*, 1993, 1994; Sheokand *et al.*, 1995; Gordon *et al.*, 1997; Soussi *et al.*,

1998, 1999; Cordovilla *et al.*, 1999; Babber *et al.*, 2000; El-Hamdaoui *et al.*, 2003a, 2003b; Tejera *et al.*, 2004; Mhadhbi *et al.*, 2004; Jebara *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2005; Bouhmouch *et al.*, 2005), incluida *Medicago sativa* (Bekki *et al.*, 1987; Pocard *et al.*, 1991; Zhou *et al.*, 1992, Khailova y Larkova, 1992; Douka *et al.*, 1993; Serraj y Drevon, 1998).

Por otra parte, observamos una menor reducción en la capacidad fijadora de nitrógeno de los nódulos formados por las bacterias que expresan la proteína flavodoxina por efecto del tratamiento salino durante 2 (25%), 3 (40%) y 4 días (60%) con respecto a los nódulos control. Sin embargo, la reducción en la biomasa fue similar a la observada en las plantas noduladas por *S. meliloti* control. Es posible que a largo plazo, puedan manifestarse diferencias en producción de biomasa o algunos otros parámetros morfológicos.

El estrés salino induce un descenso en la captación de oxígeno de los nódulos y en la permeabilidad al oxígeno (Serraj *et al.*, 1994; Vance y Heichel, 1991; González *et al.*, 2001; Serraj *et al.*, 2001). El descenso en la permeabilidad se ha asociado a la contracción de las células del cortex interno (Serraj *et al.*, 1995) y al incremento en el contenido de ABA (Drevon *et al.*, 2001). De esta manera, se reduce la disponibilidad del oxígeno para los bacteroides, disminuye su tasa respiración (Delgado *et al.*, 1993) y se estimulan las rutas fermentativas. A su vez, la inhibición de la nitrogenasa conlleva una acumulación de oxígeno en las zonas infectadas del nódulo que activan los mecanismos osmoreguladores que inducen el descenso de la permeabilidad al oxígeno (Drevon *et al.*, 2001) y aumentan la producción de ROS. No obstante, Aydi *et al.* (2004) proponen un primer aumento en la conductividad o difusión al oxígeno como respuesta al déficit respiratorio de los bacteroides. Además han correlacionado una mayor sensibilidad a la salinidad en aquellos genotipos que proyectan un mayor aumento de la conductancia (Aydi *et al.*, 2004).

Si bien la efectividad de la fotosíntesis se ve drásticamente afectada por el estrés salino (Parida y Das, 1995), el descenso de fotosintatos suministrados al nódulo propuesto por Bekki *et al.* (1987) no parece ser la causa de la inhibición de la nitrogenasa dado que los azúcares solubles siguen acumulándose en el nódulo (James *et al.*, 1993; Singh *et al.*, 2005). En este sentido, la acumulación de sacarosa se ha asociado a la inhibición de las enzimas del catabolismo de la sacarosa y en especial de la actividad SS (Anthon y Emerich, 1990; Gordon *et al.*, 1997, 1999; Arrese-Igor *et al.*, 1999; González *et al.*, 2001). Esto conllevaría una deficiencia en el suministro de



esqueletos carbonados a los bacteroides, que junto con una reducción en la respiración de los bacteroides (Delgado *et al.*, 1993) podría explicar el descenso en la fijación de nitrógeno.

En las plantas de *Medicago sativa* observamos un descenso significativo en la actividad SS y un importante incremento en la actividad PEPc por efecto del estrés salino (3 días 100 mM NaCl). En los nódulos formados por las bacterias que expresan la proteína flavodoxina, el incremento de la actividad PEPc fue similar al de los nódulos control, pero el descenso de la actividad SS fue significativamente menor. El descenso en la actividad SS de los nódulos inducido por el estrés salino ha sido observado y descrito en varios trabajos (Gordon *et al.*, 1997, 1999; Soussi *et al.*, 1999; Verdoy, 2004). Se ha propuesto incluso, una regulación inhibidora de la actividad SS como respuesta a las perturbaciones ambientales (Gordon *et al.*, 1997). Del mismo modo, en algunos trabajos se ha descrito como el estrés salino incrementa enormemente la actividad PEPc de los nódulos (Irigoyen *et al.*, 1992; Delgado *et al.*, 1993; Soussi *et al.*, 1998, 1999; Pliego *et al.*, 2000; Verdoy, 2004; Singh *et al.*, 2005). Además, se han observado elevadas actividades de la PEPc en simbiosis con cierta tolerancia al estrés salino (Pliego *et al.*, 2000), si bien el incremento en la actividad PEPc por efecto del estrés salino es menor en los nódulos de las simbiosis más tolerantes a la salinidad (Singh *et al.*, 2005). El menor descenso de la actividad SS por efecto del estrés salino en los nódulos de las bacterias que expresan la flavodoxina, aparentemente supone una mayor disponibilidad de esqueletos carbonados para los bacteroides.

El aumento de la efectividad del complejo nitrogenasa y/o la mejora de los sistemas antioxidantes, fueron las principales ideas propuestas y discutidas para explicar el efecto de la flavodoxina sobre el mantenimiento de la fijación de nitrógeno observado durante la senescencia natural. Ambas hipótesis, podrían encajar en la interpretación de la protección de la capacidad fijadora de nitrógeno de los nódulos sometidos a estrés salino.

Como ya hemos visto, ante la menor disponibilidad de esqueletos carbonados y de oxígeno, una mayor eficiencia del complejo nitrogenasa debido al suministro de poder reductor procedente de otras fuentes alternativas de origen fermentativo (catabolismo del ácido pirúvico mediante la POR para la reducción de la flavodoxina) podría suponer una menor descenso en la fijación de nitrógeno en condiciones de salinidad.

Igualmente, la expresión de flavodoxina en los nódulos, podría constituir una mejora de los sistemas de detoxificación (elevada capacidad de reacción con ROS y facilidad de reciclado con una fuente de electrones) ante el desequilibrio ROS – antioxidantes descrito durante el estrés salino.

En este sentido, el equilibrio fisiológico que tiene lugar en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa es muy frágil, y por tanto susceptible de sufrir senescencia temprana, particularmente, cuando la planta es sometida a condiciones de estrés. El estrés salino conlleva un incremento en la producción de ROS y del daño oxidativo e induce la senescencia prematura de los nódulos (Comba *et al.*, 1998; Zahran, 1999; Swaraj y Bishnoi, 1999; Becana *et al.*, 2000 Matamoros *et al.*, 2003; Aydi *et al.*, 2004). El estrés salino acelera la coloración verde de los nódulos y el descenso en la leghemoglobina parámetros considerados indicadores del proceso de senescencia (Wilson, 1970; Yousef y Sprent, 1983; Delgado *et al.*, 1993). En general, hay un descenso en la cantidad total de proteínas (Delgado *et al.*, 1993; Cordovilla *et al.*, 1999; Tejera *et al.*, 2004; Mhadhbi *et al.*, 2004; Jebara *et al.*, 2005) que según Palma *et al.* (2002) procede de la degradación de proteínas mediada por las proteasas y ROS junto con el descenso en la síntesis de proteínas como resultado del metabolismo alterado del bacterioide (Delgado *et al.*, 1993). Los sistemas antioxidantes sufren alteraciones en las actividades y niveles de algunas de sus enzimas y metabolitos (Swaraj y Bishnoi, 1996; Becana *et al.*, 2000 Matamoros *et al.*, 2003). La capacidad detoxificadora de los nódulos es notablemente más elevada que la de las raíces y su papel e importancia ya ha sido anteriormente objeto de discusión.

La actividad SOD de los nódulos descendió significativamente en las plantas de *Medicago sativa* sometidas al estrés salino (3 días 100 mM NaCl). Dado que el descenso en la actividad SOD fue similar en ambos tipos de nódulos, la expresión de flavodoxina en los nódulos no parece tener un efecto apreciable sobre la actividad SOD. Tejera *et al.* (2004) observaron un descenso en la actividad SOD como consecuencia del estrés salino. Del mismo modo, el descenso en la actividad SOD de los nódulos ha sido asociado a la incidencia de estreses ambientales similares (Gogorcena *et al.*, 1995; Rubio *et al.*, 2002). No obstante, existen otros trabajos donde no hay alteración en la actividad SOD (Mhadhbi *et al.*, 2004), o incluso un incremento de la misma (Jebara *et al.*, 2005) por efecto del estrés salino.

Por su parte, la actividad CAT se vio incrementada significativamente de manera similar en ambos tipos de nódulos por efecto del estrés salino. La expresión de



flavodoxina en los nódulos no altera los niveles de actividad de la CAT en las condiciones estudiadas de estrés salino. Tejera *et al.* (2004) observaron un incremento de la actividad CAT como consecuencia del estrés salino. Sin embargo, en otros trabajos, se ha observado un descenso en la actividad (Sheokand *et al.*, 1995; Mhadhbi *et al.*, 2004; Jebara *et al.*, 2005).

Probablemente las diferencias en el diseño experimental de los trabajos (simbiosis, condiciones, tratamiento, etc.) puedan explicar la disparidad de los resultados referenciados para el comportamiento de las actividades SOD y CAT.

En los nódulos de alfalfa se observó un descenso significativo en las actividades APX, MDHAR, DHAR y GR. Se han descrito descensos en las actividades de algunas enzimas del ciclo ascorbato-glutation asociados al estrés salino (Sheokand *et al.*, 1995; Matamoros *et al.*, 1999; Tejera *et al.*, 2004; Jebara *et al.*, 2005) y a otros estreses ambientales (Rubio *et al.*, 2002; Hernández-Jiménez *et al.*, 2002). Se observó una disminución en el contenido de GSH, un aumento del GSSG y un deterioro del balance redox de glutatión, al igual que observaron Hernández-Jiménez *et al.* (2002) en nódulos de lupino estresados por oscuridad y Matamoros *et al.* (1999) en nódulos de guisante y haba estresados por oscuridad y nitratos respectivamente. De nuevo, la determinación de los niveles de ascorbato y dehidroascorbato contribuirá a la discusión del posible efecto de la expresión de la flavodoxina sobre el ciclo ascorbato-glutation. No obstante, y como ya se apuntó en los estudios de senescencia natural, la flavodoxina podría tener efecto sobre la actividad detoxificadora del ascorbato (AsA *per se* y APX) y sobre la regeneración de sus niveles vía DHAR y GR mediante el GSH.

Existen varios trabajos que estudian la senescencia inducida y detallan las alteraciones estructurales y ultraestructurales del nódulo por la incidencia de diferentes estreses ambientales (Vance *et al.*, 1980; Mrema *et al.*, 1997; Sheokand *et al.*, 1998; Matamoros *et al.*, 1999; Hernández-Jiménez *et al.*, 2002; Carpena *et al.*, 2003; Ramos *et al.*, 2003) incluido el estrés salino (James *et al.*, 1993; Serraj *et al.*, 1995; Babber *et al.*, 2000; El-Hamdaoui *et al.*, 2003; Verdoy, 2004).

En los nódulos control de *Medicago sativa* sometidos a estrés salino, se observaron importantes alteraciones en su estructura y organización. El estrés salino afectó fundamentalmente a las zonas menos maduras ( $Z_{II}$ ,  $Z_{II-III}$  y  $Z_{III}$  distal). Probablemente debido a que los procesos de diferenciación que en ellos tienen lugar, sufrieron importantes bloqueos o alteraciones. Se observaron células muy irregulares con una aparente pérdida de turgencia y reducción de los espacios intercelulares de

manera similar a los descritos por otros autores (Serraj *et al.*, 1995; Babber *et al.*, 2000; El-Hamdaoui *et al.*, 2003).

La acumulación de bacteroides liberados en las células de la  $Z_{II}$  distal probablemente se deba al cese total o parcial de la actividad meristemática de la  $Z_I$ , tal y como propusieron Babber *et al.* (2000) en nódulos de *Cicer arietinum* afectados por salinidad. De esta manera, las células con bacteroides recién liberados continúan ocupando posiciones distales ante la ausencia de nuevas células incorporados por la actividad del meristemo. A lo largo de la  $Z_{II}$  la diferenciación de los bacteroides se vio notablemente afectada, encontrándose bacteroides atípicos con espacios peribacteroidales engrosados y citoplasmas muy alterados (Babber *et al.*, 2000; Verdoy, 2004). Esto mismo, se observó en la parte más distal de la  $Z_{III}$  lo que parece indicar que los bacteroides menos diferenciados o maduros son más susceptibles de sufrir alteraciones por el estrés salino. Así, en el resto de la  $Z_{III}$ , los bacteroides ya diferenciados presentaban un menor grado de deterioro.

Se observó una reducción en la cantidad de almidón típicamente acumulado en la  $Z_{II-III}$  que podría deberse a la reducción en el suministro de fotosintatos al nódulo (anteriormente discutido) o al consumo del mismo por los bacteroides de las células infectadas que no se incorporan a la  $Z_{III}$  por el bloqueo en el desarrollo del nódulo. Igualmente se observó una gran vacuolización de las células y la aparición de múltiples vesículas. Verdoy (2004), describió la vacuolización de las células del nódulo y la aparente acumulación de solutos en ellas y les propuso un papel en el ajuste osmótico y detoxificación del citosol según Hasegawa *et al.* (2000). La aparición de numerosas vesículas, se ha correlacionado con la plasmolisis de las células infectadas del nódulo (Babber *et al.*, 2000). La desorganización de los orgánulos subcelulares y la aparición de mitocondrias con formas engrosadas y alargadas ha sido descrito en la senescencia inducida por múltiples estreses ambientales (Puppo *et al.*, 2005). En el estudio complementario mediante microscopia electrónica de barrido a baja temperatura, de acuerdo a Verdoy (2004), se observaron células infectadas con bacteroides muy alterados junto a otras menos alteradas y algunas células estaban completamente colapsadas. En este sentido, El-Hamdaoui *et al.* (2003) observaron nódulos de guisante sometidos a estrés salino morfológicamente muy alterados, en los que no se aprecian zonas diferenciadas.

Por su parte, los nódulos formados por las bacterias que expresan flavodoxina, sufrieron un menor deterioro por efecto del estrés salino. Tanto el desarrollo del nódulo



y la diferenciación de las zonas, como la liberación, ocupación y diferenciación de los bacteroides, se vieron menos afectados que los nódulos control. Si bien no se describió la vacuolización de las células ni la presencia de vesículas, sí se observaron mitocondrias con formas alargadas. En los nódulos estudiados mediante microscopía electrónica de barrido a baja temperatura, se observaron células infectadas con bacteroides aparentemente inalterados. De nuevo, el mantenimiento funcional de la zona de fijación podría explicar las diferencias en las tasas de fijación de nitrógeno entre los nódulos estresados por la salinidad.

La acumulación de almidón de la Z<sub>II-III</sub> fue mayor que la de los nódulos control, aunque menor a la de los nódulos no estresados. Tanto el menor bloqueo del desarrollo del nódulo, como la mayor tasa de fotosintatos suministrados a los nódulos (anteriormente propuesta y discutida para el retardo de la senescencia natural) podrían explicar esta mayor acumulación. Además, apareció una importante acumulación de almidón a lo largo de la Z<sub>III</sub>, en las células corticales contiguas, y las células de la corteza basal próximas a los haces vasculares, superior incluso a la descrita en estos nódulos no estresados. Se ha descrito el aumento de almidón en plantas de *Medicago sativa* sometidas a estrés salino, especialmente en aquellos genotipos seleccionados *in vitro* por su tolerancia al estrés osmótico (Djilianov *et al.*, 2003). La acumulación de almidón superior a los nódulos control estresados, junto con la mayor actividad SS, es compatible con la idea propuesta de una mayor tasa de fotosintatos suministrados a los nódulos formados por la bacterias que expresan flavodoxina.

James *et al.* (1993) proponen que la mayoría de las alteraciones estructurales descritas tienen como fin atenuar la toxicidad iónica y/o el daño oxidativo producidos por el estrés salino. En este sentido, la supuesta mejora de los sistemas antioxidantes mediante la expresión de la flavodoxina tendría importantes consecuencias estructurales además de un balance redox menos desequilibrado.

De nuevo, determinaciones del metabolismo del almidón, de la cantidad de nitrógeno fijado, de los suministros de fotosintatos, de la respiración bacteroidal y de la permeabilidad al oxígeno en los diferentes nódulos sometidos al estrés salino, aportarían nuevos datos que ayudarían a interpretar el efecto de la flavodoxina sobre la estructura y efectividad de los nódulo sometidos al estrés salino.

## 5. Expresión de la proteína flavodoxina de *Anabaena variabilis* en plantas de *Medicago truncatula*

*Medicago truncatula*, es una leguminosa forrajera muy común en Australia y en toda la cuenca Mediterránea. A diferencia de la alfalfa común, *Medicago sativa*, que es tetraploide y no puede autopolinizarse, *Medicago truncatula* tiene dos juegos cromosómicos (diploide) y es autógama. El pequeño genoma de *Medicago truncatula* (Barker *et al.*, 1997; Cook, 1999), el corto tiempo de regeneración que precisa de semilla a semilla (Cook, 1999), la elevada tasa de transformación (Trinh *et al.*, 1998), su enorme parecido genético con la alfalfa común y la capacidad de establecer relaciones simbióticas con micorrizas y rizobacterias (Harrison y Dixon, 1993; Barker *et al.*, 1997) le convierten en una excelente leguminosa modelo (Udvardi, 2001). Por ello, hemos utilizado plantas de *Medicago truncatula* para la expresión de la proteína flavodoxina.

La transformación de *Medicago truncatula* mediante *Agrobacterium tumefaciens* según Trinh *et al.* (1998) constituye un método muy contrastado y exitoso frente a otros métodos descritos (Trieu *et al.*, 2000; Chabaud *et al.*, 1996; Kamate *et al.*, 2000; Araujo *et al.*, 2004). La técnica ha sido utilizada por numerosos grupos científicos en el ámbito de las interacciones planta-microorganismo en sus trabajos de investigación tanto básica como aplicada (Sheokand *et al.*, 2005; Frendo *et al.*, 2005; Rodríguez-Llorente *et al.*, 2004; Vinardell *et al.*, 2003; Hohnjec *et al.*, 2003; Buchner *et al.*, 2002; Staehelin *et al.*, 2001; Jiménez-Zurdo *et al.*, 2000; Charon *et al.*, 1999; Cebolla *et al.*, 1999). En nuestro laboratorio hemos puesto a punto y utilizado con éxito la transformación de *Medicago truncatula* de forma repetida (Verdoy, 2004).

En este trabajo, se transformaron y regeneraron plantas de *Medicago truncatula* y se realizó una primera selección mediante ensayos GUS, *southern blot* y amplificación por PCR de una línea de interés (nº 43) para la realización de un estudio preliminar del efecto de la expresión de la flavodoxina sobre la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa sometida a estrés salino y en condiciones control. Además se confirmó la expresión del transgén en la línea pre-seleccionada (T1-Fld1-43), comprobando los niveles de ARN mensajero y de proteína mediante RT-PCR y *western blot*.

Los cloroplastos o plastidios constituyen uno de los principales orgánulos de producción de ROS (Foyer *et al.*, 1994; Foyer y Noctor, 2000) y además, Lucas *et al.* (1998) han descrito que los plastidios son los últimos orgánulos que se destruyen en las células de los nódulos senescentes. Por todo ello, la construcción del transgén incluyó la presencia de un péptido tránsito para dirigir la flavodoxina al cloroplasto. Presumiblemente, al igual que la mayoría de las proteínas de los plastidios, la flavodoxina codificada en el material del núcleo, será sintetizada en el citosol como un



polipéptido que contiene una extensión N-terminal ó péptido tránsito. El péptido tránsito de la *fnr* dirigirá la proteína al cloroplasto (Keegstra y Cline, 1999) y posteriormente será eliminado por las peptidasas del plastidio (May y Soll, 1999). No obstante, y debido a la condición preliminar del trabajo, tanto la localización como el seguimiento de la flavodoxina en las células de *Medicago truncatula* y en particular en los nódulos, serán objeto de posteriores estudios.

## 6. Estudios preliminares del efecto de la flavodoxina en plantas transgénicas de *Medicago truncatula* crecidas en condiciones normales y sometidas a estrés salino

Existen numerosos trabajos donde la transformación de las plantas ha generado efectos negativos sobre el desarrollo normal de la planta o sobre algunas características o funciones en particular. Ya sean efectos directos debidos a la actividad del propio transgén o efectos indirectos derivados del punto de inserción. En la línea estudiada, aparentemente la transformación de las plantas con el gen *fld* no afectó al crecimiento y desarrollo de las plantas, ni a la capacidad de establecer simbiosis con *Sinorhizobium meliloti* y formar nódulos funcionales (Fix<sup>+</sup>).

En ausencia de estrés salino, la capacidad de fijar nitrógeno fue similar en las plantas de 24 dpi de *Medicago truncatula* (wt y Fld). El estrés salino provocó un descenso de la capacidad fijadora de nitrógeno del 52% en las plantas wt y del 32% en las plantas transgénicas. Aunque existe una aparente diferencia de sensibilidad al estrés salino, no hay diferencias significativas entre las plantas wt y Fld sometidas al estrés salino. Dado que la tendencia mostrada es muy notable, probablemente posteriores estudios con un abanico más amplio de condiciones de salinidad (días y/o concentraciones), así como un diseño experimental estadísticamente más potente, revelen diferencias significativas en este sentido. Si así fuese, de nuevo, el aumento en la efectividad del complejo nitrogenasa y/o la mejora de los sistemas antioxidantes constituirían las principales ideas e hipótesis en la interpretación de la protección de la capacidad fijadora de nitrógeno de los nódulos sometidos a estrés salino.

Al igual que sucedió en las plantas de *Medicago sativa* inoculadas con *Sinorhizobium meliloti* (wt y pFAJ1709-Fld), la reducción en la biomasa producida por efecto del estrés salino, fue similar en ambas plantas. No obstante, además se prolongó el estrés salino durante 6 días, donde la actividad nitrogenasa es prácticamente inapreciable, para determinar posibles diferencias en la sensibilidad al estrés salino.

Aunque no hubo diferencias significativas en ninguno de los parámetros estudiados entre las plantas de *Medicago truncatula* (wt y Fld) sometidas al estrés salino, se pudo apreciar una cierta tendencia más favorable de las plantas transgénicas en la reducción de biomasa, altura y número de trifolios por efecto del estrés salino. Tal y como apuntábamos anteriormente, futuros estudios basados en diseños experimentales más amplios, podrán dilucidar si estas tendencias, efectivamente responden a diferencias estadísticamente significativas.

En las determinaciones del metabolismo oxidativo de los nódulos sometidos al estrés salino, se observaron alteraciones similares a las descritas en los nódulos de las plantas de *Medicago sativa*, en los niveles y actividades de los antioxidantes estudiados: descensos significativos de las actividades SOD, APX, MDHAR, DHAR y GR y de los niveles de GSH y del balance GSH/GSSG, y aumento significativo de la actividad CAT y de los niveles de GSSG. Del mismo modo, en las determinaciones del metabolismo carbonado, se observó un fuerte incremento de la actividad PEPc y un descenso de la actividad SS como consecuencia del estrés salino, tal y como se describió en los nódulos de las plantas de *Medicago sativa*.

La expresión de flavodoxina en las células del nódulo de *Medicago truncatula*, no tuvo ningún efecto sobre las actividades SOD, MDHAR y DHAR del metabolismo oxidativo. Sin embargo, las actividades APX y GR así como los niveles y balances del GSH y GSSG, sufrieron una menor alteración como consecuencia del estrés salino. Concretamente, el descenso de la actividad APX en los nódulos de las plantas transgénicas estresadas no fue significativo. Los nódulos de las plantas transgénicas presentaron una actividad APX significativamente superior a la de los nódulos de las plantas control. De manera similar ocurre con el descenso de la actividad GR que resulta mucho menor y en consecuencia la actividad GR de los nódulos de las plantas transgénicas es significativamente superior a la de los nódulos de las plantas control. La mayor actividad GR puede explicar el balance GSH/GSSG más favorable en los nódulos de las plantas transgénicas sometidas a estrés salino. Parece ser por tanto, que la expresión de la flavodoxina, en este caso en las células vegetales del nódulo, vuelve a tener un efecto positivo sobre el metabolismo oxidativo del nódulo en condiciones de estrés salino. Aparentemente, la expresión de la flavodoxina en las plantas, no tuvo efecto sobre las actividades enzimáticas SS y PEPc del metabolismo carbonado de los nódulos.



Numerosos progresos en la identificación y caracterización de los mecanismos naturales que permiten a las plantas tolerar elevadas concentraciones de sal han posibilitado que la ingeniería genética constituya una estrategia factible para la obtención de tolerancias al estrés salino (Apse y Blumwald, 2002; Cushman y Bohnert, 2000). En este sentido, la síntesis de solutos compatibles, la homeostasis iónica y la protección antioxidante son las principales áreas de atención según Apse y Blumwald (2002). El aumento de los niveles antioxidantes en plantas transgénicas que sobreexpresan enzimas antioxidantes, antioxidantes no enzimáticos o compuestos que adicionalmente pueden detoxificar ROS, han supuesto importantes incrementos en la tolerancia a multitud de estreses ambientales (Tabla 1.2). Además, y a diferencia de otras aproximaciones más concretas donde se puede conseguir un aumento de tolerancia frente a un determinado estrés, la potenciación de los sistemas detoxificadores a menudo confiere multiresistencia debido a la consecuente ocurrencia del estrés oxidativo derivado de los diferentes estreses ambientales. En este sentido, probablemente la incidencia de otros estreses bióticos, abióticos o xenobióticos con un fuerte componente de estrés oxidativo sobre esta simbiosis mejorada, tengan como respuesta, una mayor tolerancia.

Muchas de las enzimas estudiadas en este trabajo han sido objeto de manipulación mediante tecnología de transferencia génica, obteniéndose plantas más tolerantes a uno o varios estreses ambientales. El aumento de la expresión de la APX en plantas de tabaco, de algodón o en *Arabidopsis thaliana*, han supuesto aumentos de tolerancia a heladas, calor y estrés oxidativo en general (Wang *et al.*, 1999; Shi *et al.*, 2001; Mugia *et al.*, 2004; Korniyev *et al.*, 2003). La manipulación del metabolismo del glutatión en plantas transgénicas ha sido una estrategia ampliamente abordada (Creissen *et al.*, 1996; Noctor *et al.*, 1998; Hofgen *et al.*, 1999; Ezaki *et al.*, 2000; Roxas *et al.*, 2000; Yoshimura *et al.*, 2004; Katsuhara *et al.*, 2005) obteniéndose en ocasiones, importantes tolerancias al estrés oxidativo en general y a algunos estreses ambientales en particular.

Aunque no se conocen con exactitud los mecanismos antioxidantes de la flavodoxina, la importancia de esta flavoproteína durante la respuestas *soxRS* en bacterias, y su restricción al mundo procariota han invitado a su utilización en plantas transgénicas para evaluar la capacidad antioxidante. Se ha descrito como la expresión de flavodoxina de bacterias en plantas transgénicas confiere tolerancia al déficit de hierro mediante la substitución de la ferredoxina de los cloroplastos (Zurbriggen, 2005a). Del

mismo modo, la expresión de flavodoxina de bacterias en plantas transgénicas de tabaco confiere resistencia a la infección con el patógeno *Xanthomonas campestris* (Zurbriggen, 2005b). Así mismo, la expresión de esta proteína en plantas de tabaco aumentó la tolerancia de estas plantas a los efectos tóxicos de ROS generado por la incidencia del múltiples fuentes de estrés ambiental: herbicida (metilviológeno), radiación ultravioleta, temperaturas extremas, sequía, irradiación y necrosis fúngica y vírica (Carrillo *et al.*; comunicación personal). Experimentos de campo se han completado recientemente en Argentina demostrando el potencial de esta tecnología y de esta construcción en particular. En estos experimentos se han comparado plantas transgénicas expresando la flavodoxina en el cloroplasto (cfl1-4) ó en el citosol (cfl5-8) y plantas no transformadas (wt). A pesar del desarrollo de los experimentos bajo suaves condiciones estacionales, las plantas transgénicas y especialmente aquellas expresan la flavodoxina en los cloroplastos, mostraron una producción de biomasa y tasa de supervivencia estadísticamente superior a la de las plantas wt (PBL Technology Release, 2002; [www.pbltechnology.com/techs/pdf/34.pdf](http://www.pbltechnology.com/techs/pdf/34.pdf)).

Así pues, las plantas transgénicas de *Medicago truncatula* que expresan flavodoxina, podrían ser buenas candidatas para su utilización en la mejora de la producción de leguminosas forrajeras en zonas áridas y semiáridas.

## 7. Efecto de la expresión de flavodoxina en nódulos de leguminosas.

Como hemos descrito, la expresión de la proteína flavodoxina de *Anabaena* en el nódulo de las leguminosas, ha supuesto el mantenimiento y protección de la actividad nitrogenasa y de la estructura y ultraestructura del nódulo durante el inicio de la senescencia y bajo condiciones de estrés salino. En este sentido se han considerado dos posibilidades o hipótesis acerca del posible efecto de la expresión de esta proteína: 1) Mejora en la eficiencia del complejo nitrogenasa y 2) Mejora de los sistemas antioxidantes.

Hemos sugerido que el aumento de la eficiencia del complejo nitrogenasa pudiera proceder del poder reductor cedido directa o indirectamente por la flavodoxina y generado desde las típicas rutas aeróbicas ó desde posibles rutas alternativas de fermentación (POR y NifF). Y por otra parte, la elevada capacidad de la flavodoxina para reaccionar con especies altamente oxidantes y la facilidad para ser reciclada con una fuente de electrones adecuada, podría constituir una mejora de los sistemas de



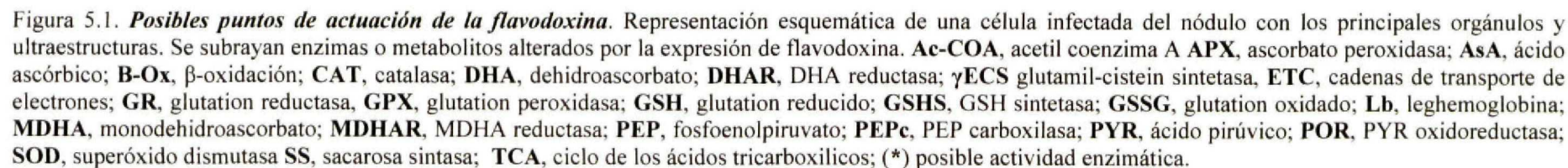
detoxificación de ROS. En ambas hipótesis, la estabilidad de la flavodoxina y más concretamente del grupo flavinmononucleotido, jugaría un papel determinante en los efectos observados. Los desequilibrios redox generados en los procesos de senescencia natural e inducida por estrés son responsables de la destrucción y deterioro de multitud de transportadores y complejos metálicos similares.

Desde esta perspectiva, un mejor estado de los procesos fisiológicos que se desarrollan en el nódulo, podrían ser responsables del mantenimiento o protección de la estructura, ultraestructura y organización subcelular de las células del nódulo.

Si asumimos que la localización de la flavodoxina expresada es exclusiva del bacteroide, los efectos observados sobre el metabolismo oxidativo del nódulo y fundamentalmente sobre el ciclo ascorbato-glutation deben proceder de: a) Actuación directa de la flavodoxina en el bacteroide sobre el ciclo ascorbato-glutation descrito en bacterias aunque todavía no en bacteroides, o b) Actuación indirecta de la flavodoxina derivada de un mejor estado o balance redox del bacteroide o una mayor eficiencia del complejo nitrogenasa.

En la figura 5.1, se representa una célula infectada del nódulo con los principales orgánulos subcelulares y ultraestructuras. Se ha esquematizado la actividad del complejo nitrogenasa y la procedencia de los requerimientos energéticos y del poder reductor, así como las principales reacciones de detoxificación de ROS con el fin de englobar todos los posibles puntos de actuación de la flavodoxina.







## **Conclusiones**

---

1. La expresión de flavodoxina de *Anabaena variabilis* en *Escherichia coli* y en las rizobacterias *Sinorhizobium meliloti* y *Pseudomonas fluorescens* confiere tolerancia al estrés oxidativo.
2. La expresión de flavodoxina de *Anabaena variabilis* en *Escherichia coli* y en las rizobacterias *Sinorhizobium meliloti* y *Pseudomonas fluorescens* confiere tolerancia a los herbicidas metilviológeno y atrazina.
3. La expresión de flavodoxina de *Anabaena variabilis* en bacterias de *Sinorhizobium meliloti* no altera su capacidad simbiótica en plantas de *Medicago sativa*.
4. La expresión de flavodoxina de *Anabaena variabilis* en bacteroides de *Sinorhizobium meliloti* de nódulos de *Medicago sativa* induce cambios en el metabolismo oxidativo y da lugar a un retraso de la senescencia de los nódulos, caracterizado por el mantenimiento de la capacidad fijadora de nitrógeno y una presencia menor de las alteraciones ultraestructurales características de la senescencia nodular.
5. La expresión de flavodoxina de *Anabaena variabilis* en bacteroides de *Sinorhizobium meliloti* de nódulos de *Medicago sativa* da lugar a una mayor acumulación de almidón en las células del nódulo y de la raíz.
6. La expresión de flavodoxina de *Anabaena variabilis* en bacteroides de *Sinorhizobium meliloti* de nódulos de *Medicago sativa* da lugar a un incremento en la tolerancia al estrés salino caracterizado por un menor descenso en la capacidad fijadora de nitrógeno, una menor alteración del metabolismo oxidativo y de las características ultraestructurales del nódulo. Se produce además, una mayor acumulación de almidón en las células del nódulo y de la raíz en plantas sometidas a estrés salino.
7. La expresión de la proteína flavodoxina de *Anabaena variabilis* en plantas transgénicas de *Medicago truncatula* no altera su capacidad simbiótica con *Sinorhizobium meliloti* y da lugar a un incremento en la tolerancia al estrés salino caracterizado por un menor descenso en la capacidad fijadora de nitrógeno y una menor alteración del metabolismo oxidativo en condiciones de estrés.



## **Bibliografía**

**Abdalla, M.H. y Omar, S.A.** (1993). Herbicides effects on nodulation, growth and nitrogen yield of faba bean induced by indigenous *Rhizobium leguminosarum*. *Zentralblatt für Mikrobiologie* **148**: 593-597.

**Abdel-Wahab, A.M. y Zahran, H.H.** (1979). Salt tolerance of *Rhizobium* species in broth cultures. *Zeitschrift für Allgemeine Mikrobiologie* **19**: 681-685.

**Abdel-Wahab, A.M. y Zahran, H.H.** (1983). The effect of water-stress on  $N_2(C_2H_2)$ -fixation and growth of *Medicago-sativa* L. *Acta Agronomica Academiae Scientiarum Hungaricae* **32**: 114-118.

**Abdel-Wahab, H.H. y Zahran, H.H.** (1981). Effects of salt stress on nitrogenase activity and growth of four legumes. *Biologia plantarum* **23**: 16-23.

**Abe, H., Yamaguchi-Shinozaki, K., Urao, T., Iwasaki, T., Hosokawa, D. y Shinozaki, K.** (1997). Role of arabidopsis MYC and MYB homologs in drought- and abscisic acid-regulated gene expression. *Plant Cell* **9**: 1859-1868.

**Aebi, H.** (1984). Catalase *in vitro*. *Methods in Enzymology* **105**: 121-126.

**Alesandrini, F. Mathis, R., Van de Sype, G., Herouart, D. y Puppo, A.** (2003). Possible roles of a cysteine protease and hydrogen peroxide in soybean nodule development and senescence. *New Phytologist* **158**: 131-138.

**Allan, A.C. y Fluhr, R.** (1997). Two distinct sources of elicited reactive oxygen species in tobacco epidermal cells. *Plant Cell* **9**: 1559-1572.

**Alscher, R.G., Erturk, N. y Heath, L.S.** (2002). Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany* **53**: 1331-1341.

**Amman, E., Ochs, B. y Abel, K.J.** (1988). Tightly regulated tac promoter vectors useful for the expression of unfused and fused proteins in *Escherichia coli*. *Gene* **69**: 301-315.

**Anderson, J.V., Hess, J.L. y Chevone, B.I.** (1990). Purification, characterization, and immunological properties for 2 isoforms of glutathione-reductase from eastern white-pine needles. *Plant Physiology* **94**: 1402-1409.

**Anderson, M.E.** (1985). Determination of glutathione and glutathione disulphide in biological samples. *Methods in Enzymology* **113**: 548-555.

**Anthon, G.E. y Emerich, D.W.** (1990). Developmental regulation of enzymes of sucrose and hexose metabolism in effective and ineffective soybean nodules. *Plant Physiology* **92**: 346-351.

**Apel, K. y Hirt, H.** (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* **55**: 373-399.



- Appleby, C.A.** (1984). Leghemoglobin and *Rhizobium* respiration. *Annual Review of Plant Physiology* **35**: 443-478.
- Apse, M.P. y Blumwald, E.** (2002). Engineering salt tolerance in plants. *Current Opinion in Biotechnology* **13**: 146-150.
- Arakaki, A.K., Ceccarelli, E.A. y Carrillo, N.** (1997). Plant-type ferredoxin-NADP+ reductases: a basal structural framework and a multiplicity of functions. *The FASEB Journal* **11**: 133-140.
- Araujo, S.D., Duque, A.S.R.L.A., Dos Santos, D.M.M.F. y Fevereiro, M.P.S.** (2004). An efficient transformation method to regenerate a high number of transgenic plants using a new embryogenic line of *Medicago truncatula* cv. Jemalong. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* **78**: 123-131.
- Arora, A., Byrem, T.M., Nair, M.G. y Strasburg, G.M.** (2000). Modulation of liposomal membrane fluidity by flavonoids and isoflavonoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **373**: 102-109.
- Arrese-Igor, C., González, E.M., Gordon, A.J., Minchin, F.R., Gálvez, L., Royuela, M., Cabrerizo, P.M. y Aparicio-Tejo, P.M.** (1999). Sucrose synthase and nodule nitrogen fixation under drought and other environmental stresses. *Symbiosis* **27**: 189-212.
- Arrigoni, A.** (1994). Ascorbate system in plant development. *Journal of bioenergetics and biomembranes* **26**: 407-419.
- Arwas, R., Glenn, A.R., McKay, I.A. y Dilworth, M.J.** (1986). Properties of double mutants of *Rhizobium leguminosarum* which are defective in the utilization of dicarboxylic-acids and sugars. *Journal of General Microbiology* **132**: 2743-2747.
- Asada, K.** (1984). Chloroplasts: formation of active oxygen and its scavenging. *Methods in Enzymology* **105**: 422-429.
- Asada, K.** (1992). Ascorbate peroxidase a hydrogen peroxide-scaveninig enzyme in plants. *Physiologia Plantarum* **85**: 235-241.
- Asada, K.** (1999). The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **50**: 601-639.
- Asada, K. y Takahashi, M.** (1987). Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. *Photoinhibition* Eds. Kyle, D.J *et al.*, pp 227-287, Elsevier.
- Ashraf, M.** (1994). Breeding for salinity tolerance in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* **13**: 17-42.
- Ashton, F.M. y Crafts, A.S.** (1981). Mode of Action of Herbicides. Wiley, J. & Sons. New York, USA.

- Atkins, C.A. y Smith, P.** (2000). Ureide synthesis in legume nodules. *Prokaryotic nitrogen fixation*. E. Triplett, Ed., Wymondham: Horizon Scientific Press. pp. 559-587.
- Aydi, S., Drevon, J.J. y Abdelly, C.** (2004). Effect of salinity on root-nodule conductance to the oxygen diffusion in the *Medicago truncatula*-*Sinorhizobium meliloti* symbiosis. *Plant Physiology and Biochemistry* **42**: 833-840.
- Babber, S., Sheokand, S. y Malik, S.** (2000). Nodule structure and functioning in chickpea (*Cicer arietinum*) as affected by salt stress. *Biologia Plantarum* **43**: 269-273.
- Badawi, G.H., Kawano, N., Yamauchi, Y., Shimada, E., Sasaki, R., Kubo, A. y Tanaka, K.** (2004). Over-expression of ascorbate peroxidase in tobacco chloroplasts enhances the tolerance to salt stress and water deficit. *Physiologia Plantarum* **121**: 231-238.
- Baier, R., Schiene, K., Kohring, B., Flaschel, E. y Niehaus, K.** (1999). Alfalfa and tobacco cells react differently to chitin oligosaccharides and *Sinorhizobium meliloti* nodulation factors. *Planta* **210**: 157-64.
- Baker, N.R.** (1991). A possible role for the photosystem II in environmental perturbations of photosynthesis. *Physiologia Plantarum* **81**: 563-570.
- Baldensperger, J.B.** (1978). An iron containing superoxide dismutase from the chemo lithotrophic *Thiobacillus denitrificans* rt strain. *Archives of Microbiology* **119**: 237-444.
- Balla, G., Jacob, H.S., Balla, J., Rosenberg, M., Nath, K., Apple, F., Eaton, J.W. y Vercellotti, G.M.** (1992). Ferritin: a cytoprotective antioxidant strategem of endothelium. *Journal of Biochemical Chemistry* **267**: 18148-18153.
- Bannister, J.V., Bannister, W.H. y Rotils, G.** (1987). Aspects of the structure, function and applications of superoxide dismutase. *CRC Critical Reviews in Biochemistry* **22**: 110-180.
- Bannister, J.V., Bannister, W.H., Barra, D., Bond, J. y Bossa, F.** (1991). Evolutionary aspects of superoxide dismutase: the copper/zinc enzyme. *Free Radical Research Communications* **13**: 349-361.
- Barea, J.M., Pozo, M.J., Azcon, R. y Azcón-Aguilar, C.** (2005). Microbial co-operation in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany* **56**: 1761-1778.
- Barker, D.G., Bianchi, S., London, F., Datte, Y., Duc, G., Essas, S., Flament, P., Gallusci, P., Genier, G., Guy, P., Muel, X., Tourner, J., Denaire, J. y Huguet, T.** (1997). *Medicago truncatula*, a model plant for studying the molecular genetics of the *Rhizobium* legume symbiosis. *Plant Molecular Biology* **8**: 40-49.
- Baron, C. y Zambryski, P.C.** (1995). The plant response in pathogenesis, symbiosis, and wounding: Variations on a common theme? *Annual Review of Genetics* **29**: 107-129.



- Bashor, C.J. y Dalton, D.A.** (1999). Effects of exogenous application and stem infusion of ascorbate on soybean (*Glycine max*) root nodules. *New Phytologist* **142**: 19-26.
- Basu, U., Good, A.G. y Taylor, G.J.** (2001). Transgenic *Brassica napus* plants overexpressing aluminium-induced mitochondrial manganese superoxide dismutase cDNA are resistant to aluminium. *Plant Cell and Environment* **24**: 1269-1278.
- Becana, M., Dalton, D.A., Moran, J.F., Iturbe-Ormaetxe, I., Matamoros, M.A. y Rubio, M.C.** (2000). Reactive oxygen species and antioxidants in legume nodules. *Physiologia Plantarum* **109**: 372-381.
- Becana, M., Paris, F.J., Sandalio, L.M. y del Río L.A.** (1989). Isoenzymes of superoxide dismutase in nodules of *Phaseolus vulgaris* L., *Pisum sativum* L., and *Vigna unguiculata* (L.) Walp. *Plant Physiology* **90**: 1286-1292.
- Bekki, A., Trinchant, J.C. y Rigaud, J.** (1987). Nitrogen-fixation ( $C_2H_2$  reduction) by *Medicago* nodules and bacteroids under sodium-chloride stress. *Physiologia Plantarum* **71**: 61-67.
- Bergersen, F.J.** (1982). Root Nodules of Legumes: Structure and Functions. Ed. John Wiley, *Research Studies Press*, Chichester.
- Beyer, W., Imlay, J. y Fridovich, I.** (1991). Superoxide Dismutases. *Progress in Nucleic Acid Research* **40**: 221-253.
- Bhardwaj, K.K.R.** (1975). Survival and symbiotic characteristics of *Rhizobium* in saline-alkali soils. *Plant and Soil* **43**: 377-385.
- Bianchi, V., Eliasson, R., Fontecave, M., Mulliez, E., Hoover, D.M., Matthews, R.G. y Reichard, P.** (1993b). Flavodoxin is required for the activation of the anaerobic ribonucleotide reductase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **197**: 792-797.
- Bianchi, V., Reichard, P., Eliasson, R., Pontis, E., Krook, M., Jornvall, H. y Haggard-Ljungquist, E.** (1993a). *Escherichia coli* ferredoxin NADP<sup>+</sup> reductase: activation of *E. coli* anaerobic ribonucleotide reduction, cloning of the gene (*fpr*), and overexpression of the protein. *Journal of Bacteriology* **175**: 1590-1595.
- Bieberdorf, F.W.** (1938). The cytology and histology of the root nodules of some leguminosae. *Journal of the American Society of Agronomy* **30**: 375-389.
- Bielawski, W. y Joy, K.W.** (1986). Reduced and oxidised glutathione and glutathione reductase activity in tissues of *Pisum sativum*. *Planta* **169**: 262-272.
- Birboim, H.C. y Doly, J.** (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* **7**: 1567-1578.

**Bishnoi, N.R., Singh, H. y Swaraj, K.** (1997). Influence of sodium chloride on nitrogen fixation and enzymes associated with scavenging hydrogen peroxide in clusterbean root nodules. *Indian Journal of Experimental Biology* **35**: 193-196.

**Bland, J.M., y Altman, D.G.** (1995). Multiple significance tests: the Bonferroni method. *British Medical Journal* **310**: 170.

**Blaschkowski, H.P., Neuer, G., Ludwig-Festl, M. y Knappe, J.** (1982). Routes of flavodoxin and ferredoxin reduction in *Escherichia coli*. CoA-acylating pyruvate: flavodoxin and NADPH: flavodoxin oxidoreductases participating in the activation of pyruvate formate-lyase. *European Journal of Biochemistry* **123**: 563-569.

**Blokhina, O., Virolainen, E. y Fagerstedt, K.V.** (2002). Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of Botany* **91**: 179-194.

**Blumwald, E.** (2000). Sodium transport and salt tolerance in plants. *Current Opinion In Cell Biology* **12**: 431-434.

**Blumwald, E., Fortin, M.G., Rea, P.A., Verma, D.P.S. y Poole, R.J.** (1985). Presence of host plasma membrane type  $H^+$  ATPase in the membrane envelope enclosing the bacteroids in soybean root nodules. *Plant Physiology* **78**: 665-672.

**Bohnert, H.J. y Jensen, R.G.** (1996). Strategies for engineering water-stress tolerance in plants. *Trends in Biotechnology* **14**: 89-97.

**Bohnert, H.J. y Sheveleva, E.** (1998). Plant stress adaptations – making metabolism move. *Current Opinion In Plant Biology* **1**: 267-274.

**Bordo, D., Djinic, K. y Bolognesi, M.** (1994). Conserved patterns in the Cu, Zn superoxide dismutase family. *Journal of Molecular Biology* **238**: 366-386.

**Bouhmouch, I., Souad-Mouhsine, B., Brhada, F. y Aurag, J.** (2005). Influence of host cultivars and *Rhizobium* species on the growth and symbiotic performance of *Phaseolus vulgaris* under salt stress. *Journal of Plant Physiology* **162**: 1103-1113.

**Boundy-Mills, K., Souza, M.D., Mandelbaum, R., Wackett, L. y Sadowsky, M.** (1997). The *atzB* gene of *Pseudomonas* sp. strain ADP encodes the second enzyme of a novel atrazine degradation pathway. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 916-923.

**Bouquard, C., Ouazzani, J., Prome, J.C., MichelBriand, Y. y Plesiat, P.** (1997). Dechlorination of atrazine by a *Rhizobium* sp. Isolate. *Applied And Environmental Microbiology* **63**: 862-866.

**Bourgueais-Chaillou, P., Pérez-Alfocea, F. y Guerrier, G.** (1992). Comparative effects of n-sources on growth and physiological-responses of soybean exposed to NaCl-stress. *Journal of Experimental Botany* **43**: 1225-1233.

**Bowditch, M.I. y Donaldson, R.P.** (1990). Ascorbate free-radical reduction by glyoxysomal membranes. *Plant Physiology* **94**: 531-537.



**Bowler, C., Slooten, L., Vandenbranden, S., De Rycke, R., Botterman, J., Sybesma, C., Van Montagu, M. y Inze, D.** (1991). Manganese superoxide dismutase can reduce cellular damage mediated by oxygen radicals in transgenic plants. *EMBO Journal* **10**: 1723-1732.

**Bowler, C., Van Montague, M. y Inzé, D.** (1992). Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **43**: 83-116.

**Boyer, J.S.** (1982). Plant productivity and environmental. *Science* **218**: 443-448.

**Bradford, M.M.** (1976). Rapid and sensitive methods for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248.

**Brewin, N.J.** (1991). Development of the legume root nodule. *Annual Review of Cell Biology* **7**: 191-226.

**Briat, J.F, Lobreaux, S., Grignon, N. y Vansuyt, G.** (1999). Regulation of plant ferritin synthesis: how and why. *Cellular and Molecular Life Sciences* **56**: 155-66.

**Broughton, W.J. y Perret, X.** (1999). Genealogy of legume-*Rhizobium* symbioses. *Current Opinion in Plant Biology* **2**: 305-311.

**Buchner, P., Rochat, C., Wuilleme, S. y Boutin, J.P.** (2002). Characterization of a tissue-specific and developmentally regulated beta-1,3-glucanase gene in pea (*Pisum sativum*). *Plant Molecular Biology* **49**: 171-186.

**Buettner, G.R. y Jurkiewicz, B.A.** (1996). Chemistry and biochemistry of ascorbic acid. *Handbook of Antioxidants* Ed., Cadenas, E. y Packer, L. pp. 91-115. Dekker, New York, USA.

**Bunkelmann, J.R. y Trelease, R.N.** (1996). Ascorbate peroxidase. A prominent membrane protein in oilseed glyoxysomes. *Plant Physiology* **110**: 589-598.

**Burity, H.A., Faris, M.A. y Culman, B.E.** (1989). Estimation of nitrogen fixation and transfer from alfalfa to associated grasses in mixed swards under field conditions. *Plant and Soil* **114**: 249-255.

**Burns, A., Watt, G.D. y Wang, Z.C.** (1985). Salt inhibition of nitrogenase catalysis and salt effects on the separate protein-components. *Biochemistry* **24**: 3932-3936.

**Burton, G.W. e Ingold, K.U.** (1984).  $\beta$ -carotene: an unusual type of lipid antioxidant. *Science* **224**: 569-573.

**Busse, M.D. y Bottomley, P.J.** (1989). Growth and nodulation responses of *Rhizobium meliloti* to water-stress induced by permeating and nonpermeating solutes. *Applied and Environmental Microbiology* **55**: 2431-2436.

**Cachorro, P., Olmos, E., Ortiz, A. y Cerdá, A.** (1995). Salinity-induced changes in the structure and ultrastructure of bean root-cells. *Biologia Plantarum* **37**: 273-283.

- Caetano-Anollés, G., Crist-Estes, D.K. y Bauer, W.D.** (1988). Chemotaxis of *Rhizobium meliloti* to the plant flavone luteolin requires functional nodulation genes. *Journal of Bacteriology* **170**: 3164-3169.
- Cairo, G., Tacchini, L., Pogliaghi, G., Anzon, E., Tomasi, A. y Bernelli-Zazzera, A.** (1995). Induction of ferritin synthesis by oxidative stress. Transcriptional and post-transcriptional regulation by expansion of the "free" iron pool. *Journal of Biological Chemistry* **270**: 700-703.
- Cakmak, I. y Marschner, H.** (1988). Enhanced superoxide radical production in roots of zinc-deficient plants. *Journal of Experimental Botany* **39**: 1449-1460.
- Cardenas, L, Feijo, J.A., Kunkel, J.G., Sanchez, F., Holdaway-Clarke, T., Hepler, P.K. y Quinto, C.** (1999). *Rhizobium* nod factors induce increases in intracellular free calcium and extracellular calcium influxes in bean root hairs. *The Plant Journal* **19**: 347-352.
- Carpena, R.O., Vazquez, S., Esteban, E., Fernandez-Pascual, M., de Felipe, M.R. y Zornoza, P.** (2003). Cadmium-stress in white lupin: effects on nodule structure and functioning. *Plant Physiology and Biochemistry* **41**: 911-919.
- Casida, L.E.Jr.** (1982). *Ensifer adhaerens* gen. nov., sp. nov. a bacterial predator of bacteria in soil. *International journal of systematic bacteriology* **32**: 339-345.
- Casse, F., Boucher, C., Julliot, J.S., Michell, M. y Dénarié, J.** (1979). Identification and characterization of large plasmids in *Rhizobium meliloti* using agarose gel electrophoresis. *Journal of Bacteriology* **113**: 229-242.
- Cebolla, A., Vinardell, J.M., Kiss, E., Olah, B., Roudier, F., Kondorosi, A. y Kondorosi, E.** (1999). The mitotic inhibitor ccs52 is required for endoreduplication and ploidy-dependent cell enlargement in plants. *EMBO Journal* **18**: 4476-4484.
- Ceccarelli, E.A., Arakaki, A.K., Cortez, N. y Carrillo, N.** (2004). Functional plasticity and catalytic efficiency in plant and bacterial ferredoxin-NADP(H) reductases. *Biochimica et Biophysica Acta* **1698**: 155-165.
- Cercos, M., Santamaria, S. y Carbonell, J.** (1999). Cloning and characterization of TPE4A, a thiol-protease gene induced during ovary senescence and seed germination in pea. *Plant Physiology* **119**: 1341-1318.
- Chabaud, M., Larssonneau, C., Marmouget, C. y Huguet, T.** (1996). Transformation of barrel medic (*Medicago truncatula* Gaertn) by *Agrobacterium tumefaciens* and regeneration via somatic embryogenesis of transgenic plants with the MtENOD12 nodulin promoter fused to the gus reporter gene. *Plant Cell Reports* **15**: 305-310.
- Chandler, M.R.** (1978). Some observations on infection of *Arachis hypogea* L. by *Rhizobium*. *Journal of Experimental Botany* **29**: 749-755.
- Chang, Y.J., Hussain, A.K.M.A., Stephen, J.R., Mullen, M.D., White, D.C. y Peacock, A.** (2001). Impact of herbicides on the abundance and structure of indigenous



beta-subgroup ammonia-oxidizer communities in soil microcosms. *Environmental Toxicology And Chemistry* **20**: 2462-2468.

**Chapman, D.** (1998). Phospholipase activity during plant growth and development and in response to environmental stress. *Trends in Plant Science* **3**: 419-426.

**Charon, C., Sousa, C., Crespi, M. y Kondorosi, A.** (1999). Alteration of enod40 expression modifies *Medicago truncatula* root nodule development induced by *Sinorhizobium meliloti*. *Plant Cell* **11**: 1953-1965.

**Chatterjee, S., Choudhuri, M.M. y Ghosh, B.** (1983). Changes in polyamine contents during root nodule growth of *Phaseolus mungo*. *Phytochemistry* **22**: 1553-1556.

**Chaudhary, P., Dudeja, S.S. y Kapoor, K.K.** (2004). Effectivity of host-Rhizobium leguminosarum symbiosis in soils receiving sewage water containing heavy metals. *Microbiol Research* **159**: 121-127.

**Chen, G-X. y Asada, K.** (1989). Ascorbate peroxidase in tea leaves: occurrence of two isozymes and the differences in their enzymatic and molecular properties. *Plant and Cell Physiology* **30**: 987-998.

**Chen, T.H.H. y Murata, N.** (2000). Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. *Current Opinion in Plant Biology* **5**: 250-257.

**Chen, W.M., Chang, J.S, Wu, C.H. y Chang, S.C.** (2004). Characterization of phenol and trichloroethene degradation by the rhizobium *Ralstonia taiwanensis*. *Research in microbiology* **155**: 672-80.

**Chen, W.M., James, E.K., Prescott, A.R., Kierans, M. y Sprent, J.I.** (2003). Nodulation of *Mimosa* spp. by the beta-proteobacterium *Ralstonia taiwanensis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. **16**: 1051-1061.

**Chen, W.M., Laevens, S., Lee, T.M., Coenye, T., De Vos, P., Mergeay, M. y Vandamme, P.** (2001). *Ralstonia taiwanensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* species and sputum of a cystic fibrosis patient. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **51**: 1729-1735.

**Chen, W.X., Yan, G.H. y Li, J.L.** (1988). Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **38**: 392-397.

**Chew, O., Whelan, J. y Millar, A.H.** (2003). Molecular definition of the ascorbate-glutathione cycle in *Arabidopsis* mitochondria reveals dual targeting of antioxidant defenses in plants. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 46869-46877.

**Chinnusamy, V., Jagendorf, A. y Zhu, J.K.** (2005). Understanding and improving salt tolerance in plants. *Crop Science* **45**: 437-448.

- Choi, H., Hong, J., Ha, J., Kang, J. y Kim, S.Y.** (2000). ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors. *Journal of Biological Chemistry* **275**: 1723-1730.
- Chourey, K., Ramani, S. y Apte, S.K.** (2003). Accumulation of LEA proteins in salt (NaCl) stressed young seedlings of rice (*Oryza sativa* L.) cultivar Bura Rata and their degradation during recovery from salinity stress. *Journal of Plant Physiology* **160**: 1165-1174.
- Chu, C.C., Ludzord, P.M., Ozburn, J.L. y Sweet, R.D.** (1978). Effects of temperature and competition of the establishment and growth of redroot pigweed and common lambsquarters. *Crop Science* **18**: 308.
- Churin, Y., Schilling, S. y Borner, T.** (1999). A gene family encoding glutathione peroxidase homologues in *Hordeum vulgare* (barley). *FEBS Letters* **459**: 33-38.
- Clark, S.A. y Mahanty, H.K.** (1991). Influence of herbicides on growth and nodulation of white clover, *Trifolium repens*. *Soil Biology and Biochemistry* **23**: 725-730.
- Coba de la Peña, T., Frugier, F., McKhann, H.I., Bauer, P., Brown, S., Kondorosi, A. y Crespi, M.** (1997). A carbonic anhydrase gene is induced in the nodule primordium and its cell-specific expression is controlled by the presence of *Rhizobium* during development. *Plant Journal* **11**: 407-20.
- Coba de la Peña, T., Verdoy, D., Redondo, F.J. y Pueyo, J.J.** (2003). Salt tolerance in the *Rhizobium*-legume symbiosis: An overview. *Recent Research in Developmental Plant Molecular Biology* **1**: 187-205.
- Cohn, J., Day, R.B. y Stacey, G.** (1998). Legume nodule organogenesis. *Trends in Plant Science* **3**: 105-110.
- Colebatch, G., Desbrosses, G., Ott, T., Krusell, L., Montanari, O., Kloska, S., Kopka, J., Udvardi, M.K.** (2004). Global changes in transcription orchestrate metabolic differentiation during symbiotic nitrogen fixation in *Lotus japonicus*. *Plant Journal* **39**: 487-512.
- Comba, M.E., Benavides, M.P. y Tomaro, M.L.** (1998). Effect of salt stress on antioxidant defence system in soybean root nodules. *Australian Journal of Plant Physiology* **25**: 665-671.
- Connell, J.P. y Mullet, J.E.** (1986). Pea chloroplast glutathione-reductase - purification and characterization. *Plant Physiology* **82**: 351-356.
- Cook, D.R.** (1999). *Medicago truncatula* - a model in the making! *Current Opinion in Plant Biology* **2**: 301-304.
- Cordoba-Pedregosa, M.C., Gonzalez-Reyes, J.A., Canadillas, M., Navas, P. y Cordoba, F.** (1996). Role of apoplastic and cell-wall peroxidases on the stimulation of root elongation by ascorbate. *Plant Physiology* **112**: 1119-1125.



- Cordovilla, M.P., Ligerio, F. y Lluch, C.** (1999). Effect of salinity on growth, nodulation and nitrogen assimilation in nodules of faba bean (*Vicia faba* L.). *Applied Soil Ecology* **11**: 1-7.
- Cordovilla, M.P., Ligerio, F. y Lluch, C.** (1994). The effect of salinity on n-fixation and assimilation in *Vicia-faba*. *Journal of Experimental Botany* **45**: 1483-1488.
- Cordovilla, M.P., Ligerio, F. y Lluch, C.** (1995a). Influence of host genotypes on growth, symbiotic performance and nitrogen assimilation in Faba bean (*Vicia faba* L.) under salt stress. *Plant and Soil* **172**: 289-297.
- Cordovilla, M.P., Ocaña, F., Ligerio, F. y Lluch, C.** (1995b). Growth stage response to salinity in simbiosis *Vicia faba* - *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae*. *Plant Physiology* **14**: 105-111.
- Cordovilla, M.P., Ocaña, F., Ligerio, F. y Lluch, C.** (1995b). Salinity effects on growth análisis and nutrient composition in four grain legumes-*Rhizobium* symbiosis. *Journal of Plant Nutrition* **18**: 1595-1609.
- Corpas, F.J., Barroso, J.B. y del Rio, L.A.** (2001). Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells. *Trends in Plant Science* **6**: 145-50.
- Corpet, F.** (1988). Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Research* **16**: 10881-10890.
- Creissen, G., Broadbent, P., Stevens, R., Wellburn, A.R. y Mullineaux, P.** (1996). Manipulation of glutathione metabolism in transgenic plants. *Biochemical Society Transactions* **24**: 465-469.
- Curtis, J., Shearer, G. y Kohl, D.H.** (2004). Bacteroid proline catabolism affects N(2) fixation rate of drought-stressed soybeans. *Plant Physiology* **136**: 3313-3318.
- Cushman, J.C. y Bonhert, H.J.** (2000). Genomic approaches to plant stress tolerance. *Current Opinion In Plant Biology* **3**: 117-124.
- Dalton, D.A.** (1995). Antioxidant defenses of plant and fungi. *Oxidative Stress and Antioxidant Defenses in Biology* Ed Ahmad, A. Chapman y Hall, New York. pp. 298-355.
- Dalton, D.A., Baird, L.M., Langeberg, L., Taugher, C.Y., Anyan, W.R., Vance, C.P. y Sarath, G.** (1993a). Subcellular localization of oxygen defense enzymes in soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) root nodules. *Plant Physiology* **102**: 481-489.
- Dalton, D.A., Langeberg, L. y Robbins, M.** (1992). Purification and characterization of monodehydroascorbate reductase from soybean root nodules. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **292**: 281-286.

**Dalton, D.A., Langeberg, L. y Treneman, N.C.** (1993b). Correlations between the ascorbate-glutathione pathway and effectiveness in legume root-nodules. *Plant Physiology* **87**: 365-370.

**Dalton, D.A., Post, C.J. y Langeberg, L.** (1991). Effects of ambient oxygen and of fixed nitrogen on concentrations of glutathione, ascorbate, and associated enzymes in soybean root-nodules. *Plant Physiology* **96**: 812-818.

**Dalton, D.A., Russel, S.A., Hanus, F.J., Pascoe, G.A. y Evans, H.J.** (1986). Enzymatic reactions of ascorbate and glutathione that prevent peroxide damage in soybean root nodules. *Proceedings of the National Academy of Science, U S A*, **83**: 3811-3815.

**Dat, J., Vandenabeele, S., Vranova, E., Van Montagu, M., Inze, D. y Van Breusegem, F.** (2000). Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences* **57**: 779-95.

**Day, D.A. y Copeland, L.** (1991). Carbon metabolism and compartmentation in nitrogen fixing legume nodules. *Plant Physiology and Biochemistry* **29**: 185-201.

**Dazzo, F.B., Truchet, G.L., Sherwood, J.E., Hrabak, E.M., Abe, M. y Pankratz, S.H.** (1984). Specific phases of root hair attachment in the *Rhizobium trifolii*-clover symbiosis. *Applied and Environmental Microbiology* **48**: 1140-1150.

**de Faria, S.M., Lewis, G.P., Sprent, J.I. y Sutherland, J.M.** (1989). Occurrence of nodulation in the leguminosae. *New Phytologist* **121** : 607-619.

**de Felipe, M.R., Fernández-Pascual, M.M. y Pozuelo, J.M.** (1987). Effects of herbicides Lindex and Simazine on chloroplasts and nodule development, nodule activity and grain yield in *Lupinus albus* L. cv. Multolupa. *Plant and Soil* **101**: 99-105.

**de Felipe, M.R., Lucas, M.M., Lechaire, J.P., Nicolas, G., Fernández-Pascual, M. y Pozuelo, J.M.** (1997). Comparative study of two cryotechniques to elucidate real functional aspects of legume nodule development. *Journal of Plant Physiology* **150**: 428-436.

**de Gara, L., Tommasi, F., Liso, R. y Arrigoni, O.** (1991). Ascorbic acid utilization by prolyl hydroxylase "in vivo". *Phytochemistry* **30**: 1397-1399.

**de Lajudie, P., Laurent-Fulele, E., Willems, A., Torck, U., Coopman, R., Collins, M.D., Kersters, K., Dreyfus, B. y Gillis, M.** (1998) *Allorhizobium undicola* gen. nov., sp. nov., nitrogen-fixing bacteria that efficiently nodulate *Neptunia natans* in Senegal. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **48**: 1277-1290.

**de Leonardis, S., Dipierro, N. y Dipierro, S.** (2000). Purification and characterization of an ascorbate peroxidase from potato tuber mitochondria. *Plant Physiology and Biochemistry* **38**: 773-779.



- de Lorenzo, C., Fernández-Pascual, M. y de Felipe M.R.** (1994). Protective enzymes against active oxygen species during nitrate-induced senescence of *Lupinus albus* nodules. *Journal of Plant Physiology* **144**: 633-640.
- de Lorenzo, C., Lucas, M.M., Vivo, A. y de Felipe, M.R.** (1990). Effect of nitrate on peroxisome ultrastructure and catalase activity in nodules of *Lupinus albus* L. cv. Multolupa. *Journal of Experimental Botany* **41**: 1573-1578.
- de Souza, M., Wackett, L. y Sadowsky, M.** (1996). Atrazine chlorohydrolase from *Pseudomonas* sp. strain ADP: gene sequence, enzyme purification, and protein characterisation. *Journal of Bacteriology* **178**: 4894-4900.
- Deak, M., Horvath, G.V., Davletova, S., Torok, K., Sass, L., Vass, I., Barna, B., Kiraly, Z. y Dudits, D.** (1999). Plants ectopically expressing the iron-binding protein, ferritin, are tolerant to oxidative damage and pathogens. *Nature Biotechnology* **17**: 192-196.
- Dean, R.M., Rivers, R.L., Zeidel, M.L. y Roberts, D.M.** (1999). Purification and functional reconstitution of soybean nodulin 26. An aquaporin with water and glycerol transport properties. *Biochemistry* **38**: 347-353.
- Deistung, J. y Thorneley, N.R.** (1986). Electron transfer to nitrogenase. Characterization of flavodoxin from *Azotobacter chroococcum* and comparison of its redox potentials with those of flavodoxins from *Azotobacter vinelandii* and *Klebsiella pneumoniae* (nifF-gene product). *Biochemical Journal* **239**: 69-75.
- Deistung, J., Cannon, F.C., Cannon, M.C., Hill, S. y Thorneley, R.N.F.** (1985). Electron-transfer to nitrogenase in *Klebsiella-pneumoniae* - nifF gene cloned and the gene-product, a flavodoxin, purified. *Biochemical Journal* **231**: 743-753.
- del Río, L.A., Sandalio, L.M., Palma, J.M., Bueno, P. y Corpas, F.J.** (1992). Metabolism of oxygen radicals in peroxisomed and cellular implications. *Free Radicals in Biology and Medicine* **13**: 557-580.
- del Río, L.A., Lyon, D.S., Olah, I., Glick, B. y Salin, M.L.** (1983). Immunocytochemical evidence for a peroxisomal localization of manganese superoxide dismutase in leaf protoplasts from a higher plant. *Planta* **158**: 216-224.
- Delgado M.J., Ligero F., y Lluch, C.** (1994). Effects of salt stress on growth and nitrogen fixation by pea, faba-bean, common bean and soybean plants. *Soil Biology and Biochemistry* **26**: 371-376.
- Delgado, M.J., Bedmar, E.J y Bownie, J.A.** (1998). Genes involved in the formation and assembly of rhizobial cytochromes and their role in symbiotic nitrogen fixation. *Advances in microbial physiology* **40**: 191-231.
- Delgado, M.J., Garrido, J.M., Ligero, F. y Lluch, C.** (1993). Nitrogen fixation and carbon metabolism by nodules and bacteroids of pea plants under sodium chloride. *Physiologia Plantarum* **89**: 824-829.

- Demple, B.** (1996). Redox signaling and gene control in the *Escherichia coli* soxRS oxidative stress regulon- a review. *Gene* **179**: 53-57.
- Denarie, J., Debelle, F. y Prome, J.C.** (1996). *Rhizobium* lipo-chitoooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annual Review of Biochemistry* **65**: 503-535.
- Desikan, R., Mackerness, S.A.H., Hancock, J.T y Neill, S.J.** (2001). Regulation of the Arabidopsis transcriptosome by oxidative stress. *Plant Physiology* **127**: 159-172.
- D'Haeze, W., De Rycke, R., Mathis, R., Goormachtig, S., Pagnotta, S., Verplancke, C., Capoen, W. y Holsters, M.** (2003). Reactive oxygen species and ethylene play a positive role in lateral root base nodulation of a semiaquatic legume. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 11789-11794.
- Dimitrijevic, L., Puppo, A. y Rigaud, J.** (1984). Superoxide dismutase activities in *Rhizobium phaseoli* bacteria and bacteroids. *Archives of Microbiology* **139**: 174-178.
- Dipierro, S. y Borraccino, G.** (1991). Dehydroascorbate reductase from potato tuber. *Phytochemistry* **30**: 427-429.
- Diplock, A.T., Machlin, L.J., Packer, L., y Pryor, W.A.** (1989). Vitamin E: Biochemistry and Health Implications. *Annals of the New York Academy of Sciences* **570**: 555.
- Dixon, D.P., Cummins, L., Cole, D.J. y Edwards, R.** (1998). Glutathione-mediated detoxification systems in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **1**: 258-66.
- Dixon, R.O.D., Berlier, Y.M. y Lespinat, P.A.** (1981). Respiration and nitrogen fixation in nodulated roots of soybean and pea. *Plant Soil* **61**: 135-143.
- Djilianov, D., Prinsen, E., Oden, S., van Onckelen, H., Muller, J.** (2003). Nodulation under salt stress of alfalfa lines obtained after in vitro selection for osmotic tolerance. *Plant Science* **165**: 887-894.
- Djordjevic, M.A., Gabriel, D.W. y Rolfe, B.G.** (1987). *Rhizobium* - the refined parasite of legumes. *Annual Review of Phytopathology* **25**: 145-168.
- Doke, N., Miura, Y., Chai, H-B. y Kawakita, K.** (1991). Involvement of Active Oxygen in induction of plant defense response against infection and injury. *Active Oxygen/Oxidative Stress and Plant Metabolism* Eds Pell, E.J. y Steffen, K.L. American Society of Plant Physiology. Rockville, M.D. pp. 84-96.
- Dombrecht, B., Heusdens, C., Beullens, S., Verreth, C., Mulkers, E., Proost, P., Vanderleyden, J. y Michiels, J.** (2005). Defence of *Rhizobium etli* bacteroids against oxidative stress involves a complexly regulated atypical 2-Cys peroxiredoxin. *Molecular Microbiology* **55**: 1207-1221.



**Dombrecht, B., Vanderleyden, J. y Michiels, J.** (2001). Stable RK2-derived cloning vectors for the analysis of gene expression and gene function in gram-negative bacteria. *Molecular Plant Microbe Interactions* **14**: 426-30.

**Douka, C.E., Apostolakis, C.G. y Skarloy, V.D.** (1978). Studies of *Rhizobium-meliloti* isolated from salt-affected soils. *Annals of Applied Biology* **88**: 457-460.

**Douka, C.E., Xenoulis, A.C. y Paradellis, T.** (1993). Elemental composition of *Medicago-sativa* under saline conditions - relation to biological nitrogen-fixation. *Folia Microbiologica* **38**: 303-310.

**Dowling, D.N. y Broughton, W.J.** (1986). Competition for nodulation of legumes. *Annual Review of Microbiology* **40**: 131-157.

**Doyle, J.J.** (1998). Phylogenetic perspectives on nodulation: evolving views of plants and symbiotic bacteria. *Trends in Plant Science* **3**: 473-478.

**Drake, R., John, I., Farrell, A., Cooper, W., Schuch, W. y Grierson, D.** (1996). Isolation and analysis of cDNAs encoding tomato cysteine proteases expressed during leaf senescence. *Plant Molecular Biology* **30**: 755-767.

**Drevon, J.J., Abdelly, C., Amarger, N., Aouani, E.A., Aurag, J., Gherbi, H., Jebara, M., Lluch, C., Payre, H., Schump, O., Soussi, M., Sifi, B. y Trabelsi, M.** (2001). An interdisciplinary research strategy to improve symbiotic nitrogen fixation and yield of common bean (*Phaseolus vulgaris*) in salinised areas of the Mediterranean basin. *Journal of Biotechnology* **91**: 257-268.

**Dreyfus, B.L. y Dommergues, Y.R.** (1981). Nitrogen-fixing nodules induced by *Rhizobium* on the stem of the tropical legume *Sesbania rostrata*. *FEMS Microbiological Letters* **10**: 313-317.

**Dreyfus, B.L., Garcia, J.L. y Gillis, M.** (1988). Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., sp. nov., a stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. *International Journal of Systematic Bacteriology* **38**: 89-98.

**Droillard, M.J. y Paulin, A.** (1990). Isozymes of superoxide dismutase in mitochondria and peroxisomes isolated from petals of carnation (*Dianthus caryophyllus*) during senescence. *Plant Physiology* **94**: 1187-1192.

**Drolet, G., Dumbroff, E.B., Legge, R.L. y Thompson, J.E** (1986). Radical scavenging properties of polyamines. *Phytochemistry* **25**: 367-371.

**Drory, A. y Woodson, W.R.** (1992). Molecular cloning and nucleotide sequence of a cDNA encoding catalase from tomato. *Plant Physiology* **100**: 1605-1606.

**Drummond, M.H.** (1985). The base sequence of the *nifF* gene of *Klebsiella pneumoniae* and homology of the predicted amino acid sequence of its protein product to other flavodoxins. *Biochemical Journal* **232**: 891-896.

- Dzantor, E.K. y Felsot, A.S.** (1991). Microbial responses to large concentrations of herbicides in soil *Environmental Toxicology and Chemistry* **10**: 649-655.
- Eberbach, P.L. y Douglas, L.A.** (1991). Effect of herbicide residues in a sandy loam on the growth, nodulation and nitrogenase activity (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>/C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>) of *Trifolium subterraneum*. *Plant and Soil* **131**: 59-66.
- Edwards, E.A., Rawsthorne, S. y Mullineaux, P.M.** (1990). Subcellular-distribution of multiple forms of glutathione-reductase in leaves of pea (*Pisum sativum* L.). *Planta* **180**: 278-284.
- El Sheikh, E.A.E. y Wood, M.** (1989a). Response of chickpea and soybean rhizobia to salt - influence of carbon source, temperature and pH. *Soil Biology and Biochemistry* **21**: 883-887.
- El Sheikh, E.A.E. y Wood, M.** (1989b). Response of chickpea and soybean rhizobia to salt - osmotic and specific ion effects of salts. *Soil Biology and Biochemistry* **21**: 889-895.
- El Sheikh, E.A.E. y Wood, M.** (1990). Effect of salinity on growth, nodulation and nitrogen yield of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Journal of Experimental Botany* **41**: 1263-1269.
- El Sheikh, E.A.E. y Wood, M.** (1995). Nodulation and N<sub>2</sub> fixation by soybean inoculated with salt-tolerant rhizobia or salt-sensitive bradyrhizobia in saline soil. *Soil Biology and Biochemistry* **27**: 657-661.
- El Shinnawi, M.M., El Saify, N.A. y Waly, T.M.** (1989). Influence of the ionic form of mineral salts on growth of faba bean and *Rhizobium-leguminosarum*. *Mircen-Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* **5**: 247-254.
- El-Hamdaoui, A., Redondo-Nieto, M., Rivilla, R., Bonilla, I. y Bolaños, L.** (2003a). Effects of boron and calcium nutrition on the establishment of the *Rhizobium leguminosarum*-pea (*Pisum sativum*) symbiosis and nodule development under salt stress. *Plant Cell and Environment* **26**: 1003-1011.
- El-Hamdaoui, A., Redondo-Nieto, M., Torralba, B., Rivilla, R., Bonilla, I., Bolaños, L.** (2003b). Influence of boron and calcium on the tolerance to salinity of nitrogen-fixing pea plants. *Plant and Soil* **251**: 93-103.
- Eltner, E.F.** (1991). Mechanisms of oxygen activation in different compartments of plant cells. *Active oxygen/oxidative stress and plant metabolism*. Eds. Pell E.J. and Steffen K.L. American Society of Plant Physiology. Rockville, M.D. pp. 13-25.
- Eltner, E.F. y Oswald, W.** (1994). Mechanism of oxygen activation during plant stress. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh (B)* **102**: 131-154.
- Embalomatis, A., Papakosta, D.K. y Katinakis, P.** (1994). Evaluation of *Rhizobium-meliloti* strains isolated from indigenous populations in northern Greece. *Journal Of Agronomy and Crop Science-Zeitschrift Fur Acker Und Pflanzenbau* **172**: 73-80.



**Erhardt, D.W., Atkinson, E.M. y Long S.R.** (1992). Depolarization of alfalfa root hair membrana potencial by *Rhizobium meliloti* Nod factors. *Science* **256**: 998.

**Erhardt, D.W., Wais, R. y Long S.R.** (1996). Calcium spiking in plants root hairs membrane potential by *Rhizobium* nodulation signals. *Cell* **85**: 673.

**Escuredo, P.R., Minchin, F.R., Gorgocena, Y., Iturbe-Ormaetxe, I., Klucas, R.V. y Becana, M.** (1996). Involvement of activated oxygen in nitrate-induced senescence of pea root nodules. *Plant Physiology* **110**: 1187-1195.

**Evans, P.J., Gallesi, D., Mathieu, C., Hernández-Jiménez M.J., de Felipe, M.R., Halliwell, B. y Puppo, A.** (1999). Oxidative stress occurs during soybean nodule senescence. *Planta* **208**: 73-79.

**Ezaki, B., Gardner, R.C, Ezaki, Y. y Matsumoto, H.** (2000). Expression of aluminum-induced genes in transgenic Arabidopsis plants can ameliorate aluminum stress and/or oxidative stress. *Plant Physiology* **122**: 657-665.

**Ezaki, B., Katsuhara, M., Kawamura, M. y Matsumoto, H.** (2001). Different mechanisms of four aluminum (Al)-resistant transgenes for Al toxicity in Arabidopsis. *Plant Physiology* **127**: 918-927.

**Fadullon, F.S., Karns, J.S. y Torrents, A.** (1998). Degradation of atrazine in soil by *Streptomyces*. *Journal of Environmental Science and Health Part B-Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes* **33**: 37-49.

**Fagg, C.W. y Stewart, J.L.** (1994). The value of *Acacia* and *Prosopis* in arid and semiarid environments. *Journal of Arid Environments* **27**: 3-25.

**Fahrenholz, S.R., Doleiden, F.H., Tozzolo, A.M. y Lamola, A.A.** (1974). On the quenching of singlet oxygen by  $\alpha$ -tocopherol. *Photochemistry and Photobiology* **20**: 505-509.

**Falk, J., Krauss, N., Dähnhardt, D. y Krupinska, K.** (2002). The senescence associated gene of barley encoding 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase is expressed during oxidative stress. *Journal of Plant Physiology* **159**: 1245-1253

**Falla, T.J. y Chopra, I.** (1999). Stabilization of *Rhizobium* symbiosis plasmids. *Microbiology* **145**: 515-516.

**Fedorova, M., van de Mortel, J., Matsumoto, P.A., Cho, J., Town, C.D., VandenBosch, K.A., Gantt, J.S. y Vance, C.P.** (2002). Genome-wide identification of nodule-specific transcripts in the model legume *Medicago truncatula*. *Plant Physiology* **130**: 519-537.

**Felle, H.H., Kondorosi, E., Kondorosi, A. y Schultze, M.** (1995). Nod signal-induced plasma membrana potencial changes in alfalfa root hairs are differentially sensitive to structural modifications of the lipochitooligosaccharide. *The Plant Journal* **7**: 939-947.

- Felle, H.H., Kondorosi, E., Kondorosi, A. y Schultze, M.** (1996). Rapid alkalization in alfalfa root hairs in response to rhizobial lipochotooligosaccharide signals. *The Plant Journal* **10**: 295-301.
- Felle, H.H., Kondorosi, E., Kondorosi, A. y Schultze, M.** (1998). The role of ion fluxes of Nod factor signalling in *Medicago sativa*. *The Plant Journal* **13**: 455-463.
- Fellows, R.J., Patterson, R.P., Raper, C.D. Jr. y Harris, D.** (1987). Nodule activity and allocation of photosynthate of soybean during recovery from water stress. *Plant Physiology* **84**: 456-460.
- Fenton, H.J.H.** (1894). Oxidation of tartaric acid in the presence of iron. *Journal of the Chemical Society* **65**: 899-910.
- Fenton, H.J.H.** (1899). Oxidation of certain organic acids in the presence of ferrous salts. *Proceedings of the Chemical Society* **25**: 224.
- Ferguson, B.J. y Mathesius, U.** (2003). Signaling interactions during nodule development. *Journal of Plant Growth Regulation* **22**: 47-72.
- Fernández-Pascual, M., de Lorenzo, C., de Felipe, M.R., Rajalakshmi, S., Gordon, A.J., Thomas, B.J. y Minchin, F.R.** (1996). Possible reasons for relative salt stress tolerance in nodules of white lupin cv. Multolupa. *Journal of Experimental Botany* **47**: 1709-1716.
- Figurski, D.H. y Helinski, D.R.** (1979). Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proceedings of the National Academy of Science, USA*, **76**: 1648-1652.
- Fillat, M.F., Borrias, W.E. y Weisbeek, P.J.** (1991). Isolation and overexpression in *Escherichia coli* of the flavodoxin gene from *Anabaena* PCC 7119. *Biochemical Journal* **280**: 187-191.
- Fillat, M.F., Sandmann, G. y Gómez-Moreno, C.** (1988). Flavodoxin from nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* PCC 7119. *Archives of Microbiology* **150**: 160-164.
- Finan, T.M., Wood, J.M. y Jordan, D.C.** (1983). Symbiotic properties of c4-dicarboxylic acid transport mutants of *Rhizobium-leguminosarum*. *Journal of Bacteriology* **154**: 1403-1413.
- Fisher, A.B.** (1988). Intracellular production of oxygen-derived free radicals. *Oxygen Radicals and Tissue Injury: Proceeding of a Brook Lodge Symposium* Ed. Halliwell, B., pp 34-39.
- Fisher, R.F. y Long, S.R.** (1989). DNA footprint analysis of the transcriptional activator proteins NodD1 and NodD3 on inducible nod gene promoters. *Journal of Bacteriology* **171**: 5492-5505.
- Fita, I. y Rossmann, M.G.** (1985). The active center of catalase. *Journal of Molecular Biology* **185**: 21-37.



**Floreani, M., Petrone, M., Debetto, P. y Palatini, P.** (1997). A comparison between different methods for the determination of reduced and oxidized glutathione in mammalian tissues. *Free Radicals Research* **26**: 441-455.

**Flores, M. y Barbachano, M.** (1992). Effects of herbicides Gramoxone, Diuron and Tocatol<sup>®</sup> on growth and nodulation of three strains of *Rhizobium meliloti*. *The science of the Toral Environment* **123**: 249-260.

**Flowers, T.J. y Yeo, A.R.** (1995). Breeding for salinity resistance in crop plants. Where next? *Australian Journal of Plant Physiology* **22**: 875-884.

**Foreman, J., Demidchik, V., Barthwell, J.H.F., Mylona, P., Miedema, H., Torres, M.A., Linstead, P., Costa, S., Brownlee, C., Jones, J.D.G., Davies, J.M. y Dolan, L.** (2003). Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature* **422**: 442-446.

**Forrest, S.I., Verma, D.P.S. y Dhindsa, R.S.** (1991). Starch content and activities of starch-metabolizing enzymes in effective and ineffective root-nodules of soybean. *Canadian Journal of Botany* **69**: 697-701.

**Foster, J.G. y Edwards, G.E.** (1980). Localization of superoxide dismutase in leaves from C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> plants. *Plant Cell Physiology* **21**: 895-906.

**Foucher, F. y Kondorosi, E.** (2000). Cell cycle regulation in the course of nodule organogenesis in *Medicago*. *Plant Molecular Biology* **43**: 773-786.

**Foyer, C.H.** (2004). The role of ascorbic acid in defence networks and signalling in plants. *Vitamin C. Functions and Biochemistry in Animals and Plants* Eds Asard, H., May, J.M. y Smirnoff, S. Scientific Publishers. Oxon, UK. pp. 65-82.

**Foyer, C.H. y Halliwell, B.** (1976). The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta* **133**: 21-25.

**Foyer, C.H. y Mullineaux, P.M.** (1998). The presence of dehydroascorbate and dehydroascorbate reductase in plant tissues. *FEBS Letters* **425**: 528-529.

**Foyer, C.H. y Noctor, G.** (2000). Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signalling. *New Phytologist* **146**: 359-388.

**Foyer, C.H., Descourvières, P. y Kunert, K.J.** (1994). Protection against oxygen radicals: an important defence mechanism studies in transgenic plants. *Plant Cell and Environment* **17**: 507-523.

**Foyer, C.H., Rowell, J. y Walker, D.** (1983). Measurements of the ascorbate content of spinach leaf protoplasts and chloroplasts during illumination. *Planta* **157**: 239-244.

**Foyer, C.H., Valadier, M.H., Migge, A. y Becker, T.W.** (1998). Drought-induced effects on nitrate reductase activity and mRNA and on the coordination of nitrogen and carbon metabolism in maize leaves. *Plant Physiology* **117**: 283-292.

- Franceschi, V.R. y Tarlyn, N.M.** (2002). L-ascorbic acid is accumulated in source leaf phloem and transported to sink tissues in plants. *Plant Physiology* **130**: 649-656.
- Frank, B.** (1889). Über die Pilzsymbiose der Leguminosen. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft* **7**: 332-346.
- Frank, W., Munnik, T., Kerkmann, K., Salamini, F. y Bartels, D.** (2000). Water deficit triggers phospholipase D activity in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Plant Cell* **12**: 111-124.
- Freiberg, C., Fellay, R., Bairoch, A., Broughton, W.J., Rosenthal, A. y Perret X.** (1997). Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes. *Nature* **387**: 394-401.
- Frendo, P., Harrison, J., Norman, C., Hernández-Jiménez, M.J., Van de Sype, G., Gilabert, A. y Puppo, A.** (2005). Glutathione and homoglutathione play a critical role in the nodulation process of *Medicago truncatula*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **18**: 254-259.
- Frendo, P., Hernández-Jiménez, M.J., Mathieu, C., Duret, L., Gallesi, D., Van de Sype, G., Herouart, D. y Puppo, A.** (2001). A *Medicago truncatula* homoglutathione synthetase is derived from glutathione synthetase by gene duplication. *Plant Physiology* **126**: 1706-1715.
- Fridovich, I.** (1978). The biology of oxygen radicals. *Science* **201**: 875-880.
- Frugoli, J.A., Zhong, H.H., Nuccio, M.L., McCourt, P., McPeck, M.A. y Thomas, T.L.** (1996). Catalase is encoded by a multigene family in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Physiology* **112**: 327-336.
- Fujihara, S., Abe, H., Minakawa, Y., Akao, S. y Yoneyama, T.** (1994). Polyamines in nodules from various plant microbe symbiotic association. *Plant Cell Physiology* **35**: 1127-1134.
- Fujihara, S., Nakashima, T., Kurogochi, Y. y Yamaguchi, M.** (1986). Distribution and metabolism of sym-homospermidine and cnavallamine in sword bean *Canavalia glandiata* cv Shironata. *Plant Physiology* **82**: 795-800.
- Gage, D.J. y Margolin, W.** (2000). Hanging by a thread: invasion of legume plants by rhizobia. *Current Opinión in Microbiology* **3**: 613-617.
- Galvez, S., Hirsch, A.M., Wycoff, K.L., Hunt, S., Layzell, D.B., Kondorosi, A. y Crespi, M.** (2000). Oxygen regulation of a nodule-located carbonic anhydrase in alfalfa. *Plant Physiology* **124**: 1059-1068.
- García-Rodríguez, F.M. y Toro, N.** (2000). *Sinorhizobium meliloti* nfe (nodulation formation efficiency) genes exhibit temporal and spatial expression patterns similar to those of genes involved in symbiotic nitrogen fixation. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **13**: 583-591.



- Gaspar, T., Franck, T., Bisbis, B., Kevers, C., Jouve, L., Asuman, J.F. y Dommes, J. (2002). Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. *Plant Growth Regulation* **37**: 263-285.
- Gaudu, P., Moon, N. y Weiss, B. (1997). Regulation of the *sosRS* oxidative stress regulon. Reversible oxidation of the Fe-S centers of SoxR *in vivo*. *Journal of Biological Chemistry* **272**: 5082-5086.
- Gaworzewska, E.T. y Carlile, M.J. (1982). Positive chemotaxis of *Rhizobium leguminosarum* and other bacteria towards roots exudates from legumes and other plants. *Journal of General Microbiology* **128**: 1179-1188.
- Gennaro, G., Hubner, P., Sandmeier, U., Yakunin, A.F. y Hallenbeck, P.C. (1996). Cloning, characterization, and regulation of *nifH* from *Rhodobacter capsulatus*. *Journal of Bacteriology* **178**: 3949-3952.
- Georgiev, G.I. y Atkins, C.A. (1993). Effects of salinity on  $N_2$  fixation, nitrogen-metabolism and export and diffusive conductance of cowpea root-nodules. *Symbiosis* **15**: 239-255.
- Gerdes, K. (2000). Toxin-antitoxin modules may regulate synthesis of macromolecules during nutritional stress. *Journal of Bacteriology* **182**: 561-572.
- Geurts, R. y Bisseling, T. (2002). *Rhizobium* nod factor perception and signalling. *Plant Cell* **14** Suppl: S239-249.
- Geurts, R., Fedorova, E. y Bisseling, T. (2005). Nod factor signaling genes and their function in the early stages of *Rhizobium* infection. *Current Opinion in Plant Biology* **8**: 346-52.
- Ghittoni, N.E. y Bueno, M.A. (1995). Peanut rhizobia under salt stress: role of trehalose accumulation in strain ATCC 51466. *Canadian Journal of Microbiology* **41**: 1021-1030.
- Ghosh, P.K. y Philip, L. (2004) Atrazine degradation in anaerobic environment by a mixed microbial consortium. *Water Research* **38**: 2277-2284.
- Gibson, T.J. (1984). Studies on the Epstein-Barr virus genome. *Ph.D. thesis*, Cambridge University, United Kingdom.
- Gogorcena, Y., Gordon, A.J., Escuredo, P.R., Minchin, F.R., Witty, J.F., Moran J.F. y Becana, M. (1997).  $N_2$  fixation, carbon metabolism, and oxidative damage in nodules of dark-stressed common bean plants. *Plant Physiology* **113**: 1193-1201.
- Gogorcena, Y., Iturbe-Ormaetxe, I., Escuredo, P.R. y Becana, M. (1995). Antioxidant defenses against activated oxygen in pea nodules subjected to water stress. *Plant Physiology* **108**: 753-759.
- Gómez-Moreno, C., Martínez-Júlvez, M., Medina, M., Hurley J.K. y Tollin, G. (1998). Protein-protein interaction in electron transfer reactions. *Biochimie* **80**: 837-846.

**González, E.M., Aparicio-Tejo, P.M., Gordon, A.J., Minchin, F.R., Royuela, M. y Arrese-Igor, C.** (1998). Water-deficit effects on carbon and nitrogen metabolism of pea nodules. *Journal of Experimental Botany* **49**: 1705-1714.

**González, E.M., Gálvez, L. y Arrese-Igor, C.** (2001). Absciscic acid induces a decline in nitrogen fixation that involves leghaemoglobin, but is independent of sucrose synthase activity. *Journal of Experimental Botany* **52**: 285-293.

**González, E.M., Gálvez, L., Royuela, M., Aparicio-Tejo, P.M. y Arrese-Igor, C.** (2001). Insights into the regulation of nitrogen fixation in pea nodules: lessons from drought, absciscic acid and increased photoassimilate availability. *Agronomie* **21**: 607-613.

**Gonzalez-Reyes, J.A., Hidalgo, A., Caler, J.A., Palos, R. y Navas, P.** (1994). Nutrient uptake changes in ascorbate free radical-stimulated onion roots. *Plant Physiology* **104**: 271-276.

**González-Sama, A., Lucas, M.M., de Felipe, M.R. y Puedo, J.J.** (2004) An unusual infection mechanism and nodule morphogenesis in white lupin (*Lupinus albus*). *New Phytologist* **163**: 371-380.

**Gordon, A.J.** (1995). Sucrose metabolism to support N<sub>2</sub> fixation in legume root nodules. Eds. Tikhonovich, I.A., Provorov, N.A., Romanov, V.I. y Newton, W.E. *Nitrogen fixation: Fundamentals and Applications*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands pp 533.

**Gordon, A.J., Minchin, F.R., James, C.L. y Komina, O.** (1999). Sucrose synthase in legume nodules is essential for nitrogen fixation. *Plant Physiology* **120**: 867-877.

**Gordon, A.J., Minchin, F.R., Skot, L. y James, C.L.** (1997). Stress-induced declines in soybean N<sub>2</sub> fixation are related to nodule sucrose synthase activity. *Plant Physiology* **114**: 937-946.

**Gordon, A.J., Ryle, G.J.A., Mitchell, D.F., y Powell, C.E.** (1985). The flux of <sup>14</sup>C-labeled photosynthate through soybean root nodules during N<sub>2</sub> fixation. *Journal of Experimental Botany* **36**: 756-769.

**Gouia, H., Suzuki, A., Brulfert, J. y Ghorbal, M.H.** (2003). Effects of cadmium on the co-ordination of nitrogen and carbon metabolism in bean seedlings. *Journal of Plant Physiology* **160**: 367-376.

**Grace, S. y Logan, B.A.** (2000). Energy dissipation and radical scavenging by the plant phenylpropanoid pathway. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* **355**: 1499-1510.

**Grant, J.J. y Loake, G.J.** (2000). Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signalling in disease resistance. *Plant Physiology* **124**: 21-29.



- Graves, L.B.Jr., Trelease, R.N., Grill, A. y Becker, W.M.** (1972). Localization of glyoxylate cycle enzymes in glyoxysomes in *Euglena*. *Journal of Protozoology* **19**: 527-532.
- Green, L.S. y Emerich, D.W.** (1997). The formation of nitrogen-fixing bacteroids is delayed but not abolished in soybean infected by an alpha-ketoglutarate dehydrogenase-deficient mutant of *Bradyrhizobium japonicum*. *Plant Physiology* **114**: 1359-1368.
- Grill, E., Löffler, S., Winnacker, E.L. y Zenck, M.H.** (1989). Phytochelatin, the heavy metals binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific  $\gamma$ -glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase). *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **86**: 6838-6842.
- Grinter, N.J., G. Brewster, y Barth, P.T.** (1989). Two mechanisms necessary for the stable inheritance of plasmid RP4. *Plasmid* **22**: 203-214.
- Groten, K., Vanacker, H., Dutilleul, C., Bastian, F., Bernard, S., Carzaniga, R. y Foyer, C.H.** (2005). The roles of redox processes in pea nodule development and senescence. *Plant Cell and Environment* **28**: 1293-1304.
- Gupta, A.S., Heinen, J.L., Holaday, A.S., Burke, J.J. y Allen, R.D.** (1993). Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants that overexpress chloroplastic Cu/Zn superoxide dismutase. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **90**: 1629-1633.
- Gutiérrez Mañero, F.J., Probanza, A., Ramos, B., Colón-Flores, J.J. y Lucas-García, J.A.** (2003). Effects of culture filtrates of rhizobacteria isolated from wild Lupine on germination, growth and biological nitrogen fixation of lupine seedlings. *Journal of Plant Nutrition* **26** (5): 1101-1115.
- Haber, F. y Weiss, J.** (1934). The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proceedings of the Royal Society of London* **147**: 332-351.
- Hajdukiewicz, P., Svab, Z. y Maliga, P.** (1994). The small, versatile pPZP family of *Agrobacterium* binary vectors for plant transformation. *Plant Molecular Biology* **25**: 989-994.
- Hallenbeck, P.C. y Gennaro, G.** (1998). Stopped-flow kinetic studies of low potential electron carriers of the photosynthetic bacterium, *Rhodobacter capsulatus*: ferredoxin I and NifF. *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics* **1365**: 435-442.
- Halliwell, B. y Foyer, C.H.** (1978). Properties and physiological function of a glutathione reductase purified from spinach leaves by affinity chromatography. *Planta* **139**: 9-17.
- Halliwell, B. y Gutteridge, J.M.C.** (1986). Iron and free radical reactions: two aspects of antioxidant protection. *Trends in Biochemical Sciences* **11**: 372-375.
- Halliwell, B. y Gutteridge, J.M.C.** (1989). *Free Radicals in Medicine and Biology*. Oxford University Press, Oxford, UK.

- Hamdi, Y.A. y Al Tai A.M.** (1981). Salt tolerance of strains of *Rhizobium meliloti* and *R. trifolii* to the chlorides of sodium, calcium, and magnesium. *Egyptian Journal of Microbiology* **16**: 1-7.
- Hammond-Kosack, K.E. y Jones, J.D.** (1996). Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell* **8**: 1773-1791.
- Hardy, R.W.F., Holsten, R.D., Jackson, E.K y Burns, R.C.** (1968). The acetylene-ethylene assay for  $N_2$  fixation: Laboratory and field evaluation. *Plant Physiology* **43**: 1185-1207.
- Harris, J.M., Wias, R. y Long, S.R.** (2003). *Rhizobium*-induced calcium spiking in *Lotus japonicus*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **16**: 335-341.
- Harrison, J., Jamet, A., Muglia, C.I., Van de Syde, G., Aguilar, O.M., Puppo, A. y Frendo, P.** (2005). Glutathione plays a fundamental role in growth and symbiotic capacity of *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology* **187**: 168-174.
- Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., Zhu, J.K. y Bohnert, H.J.** (2000). Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **51**: 463-499.
- Hausladen, A. y Alschner, R.G.** (1994). Purification and characterization of glutathione-reductase isozymes specific for the state of cold-hardiness of red spruce. *Plant Physiology* **105**: 205-213.
- Havaux, M.** (1998). Carotenoids as membrane stabilizers in chloroplasts. *Trends in Plant Science* **3**: 147-151.
- Havir, E.A.** (1992). The in vivo and in vitro inhibition of catalase from leaves of *Nicotiana glauca* by 3-amino-1,2,4-triazole. *Plant Physiology* **99**: 533-537.
- Havir, E.A. y McHale, N.A.** (1989). Enhanced-peroxidatic activity in specific catalase isoenzymes of tobacco, barley, and maize. *Plant Physiology* **91**: 812-815.
- Hegedus, A., Erdei, S., Janda, T., Toth, E., Horvath, G. y Dudits, D.** (2004). Transgenic tobacco plants overproducing alfalfa aldose/aldehyde reductase show higher tolerance to low temperature and cadmium stress. *Plant Science* **166**: 1329-1333.
- Heidstra, R., Geurts, R., Franssen, H., Spaink, H.P., van Kammen, A. y Bisseling, T.** (1994). Root hair deformation activity of nodulation factors and their fate on *Vicia sativa*. *Plant Physiology* **105**: 787-797.
- Heinrich, K., Ryder, M.H. y Murphy, P.J.** (2001). Early production of rhizopine in nodules induced by *Sinorhizobium meliloti* strain L5-30. *Canadian Journal of Microbiology* **47**: 165-171.
- Helemish, F.A., Abdel-Wahab, A.M., El-Mokadem, M.T. y Abou-El-Nour, M.M.** (1991). Effect of sodium chloride salinity on the growth survival and tolerance response of some rhizobial strains. *Ain Shams Science Bull* **28**: 423-440.



**Helinski D.R., Toukdarian A.E. y Novick R.P.** (1996). Replication Control and Other Stable Maintenance Mechanism of Plasmids. *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*. Eds ASM Press, Washington, D.C. 2295-2324.

**Helms, L.R. y Swenson, R.P.** (1991). Cloning and characterization of the flavodoxin gene from *Desulfovibrio desulfuricans*. *Biochimica et Biophysica Acta* **1089**: 417-419.

**Helms, L.R. y Swenson, R.P.** (1992). The primary structures of the flavodoxins from two strains of *Desulfovibrio gigas*. Cloning and nucleotide sequence of the structural genes. *Biochimica et Biophysica Acta* **1131**: 325-328.

**Helms, L.R., Krey, G.D. y Swenson, R.P.** (1990). Identification, sequence determination, and expression of the flavodoxin gene from *Desulfovibrio salexigens*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **168**: 809-817.

**Hernández, I., Alegre, L. y Munné-Bosch, S.** (2004). Drought-induced changes in flavonoids and other low-molecular-weight antioxidants in *Cistus clusii* plants grown under Mediterranean field conditions. *Tree Physiology* **24**: 1303-1311.

**Hernández, J.A., Ferrer, M.A., Jiménez, A., Barcelo, A.R. y Sevilla, F.** (2001). Antioxidant systems and  $O_2^-/H_2O_2$  production in the apoplast of pea leaves. Its relation with salt-induced necrotic lesions in minor veins. *Plant Physiology* **127**: 817-831.

**Hernández-Jiménez, M.J.** (1998). Alteraciones del metabolismo oxidativo en la senescencia natural e inducida por oscuridad en nódulos de *Lupinus albus* L. cv Multolupa. Tesis doctoral. Universidad de Granada.

**Hernández-Jiménez, M.J., Lucas, M.M. y de Felipe, M.R.** (2002). Antioxidant defense and damage in senescing lupin nodules. *Plant Physiology and Biochemistry* **40**: 645-657.

**Herouart, D., Baudouin, E., Frendo, P., Harrison, J., Santos, R., Jamet, A., Van de Sype, G., Touati, D. y Puppo, A.** (2002). Reactive oxygen species, nitric oxide, glutathione: a key role in the establishment of the legume-*Rhizobium* symbiosis? *Plant Physiology and Biochemistry* **40**: 619-624.

**Herschbach, C. y Rennenberg, H.** (1994). Influence of glutathione (GSH) on net uptake of sulphate and sulphate transport in tobacco plants. *Journal of Experimental Botany* **45**: 1069-1076.

**Hidalgo, E., Ding, H. y Demple, B.** (1997). Redox signal transduction: mutations shifting [2Fe-2S] centers of the SoxR sensor-regulator to the oxidized form. *Cell* **88**: 121-129.

**Hideg, E., Nagy, T., Oberschall, A., Dudits, D. y Vass, I.** (2003). Detoxification function of aldose/aldehyde reductase during drought and ultraviolet-B (280-320 nm) stresses. *Plant Cell and Environment* **26**: 513-522.

- Hirkala, D.L.M. y Germida, J.J.** (2004). Field and soil microcosm studies on the survival and conjugation of a *Pseudomonas putida* strain bearing a recombinant plasmid, pADPTel. *Canadian Journal of Microbiology* **50**: 595-604.
- Hirsch, A.M.** (1992). Developmental biology of legume nodulation. *New Phytologist* **122**: 211-237.
- Hirsch, A.M.** (1999). Role of lectins (and rhizobial exopolysaccharides) in legume nodulation. *Current Opinión in Plant Biology* **2**: 320-326.
- Hirsch, A.M. y Fang, Y.** (1994). Plant hormones and nodulation: what's the connection? *Plant Molecular Biology* **26**: 5-9.
- Hoffmann, B., Trinh, H.T., Leung, J., Kondorosi, A. y Kondorosi, E.** (1997). A new *Medicago truncatula* line with superior *in vitro* regeneration, transformation and symbiotic properties isolated through cell culture selection. *Molecular Plant Microbe Interactions* **10**: 307-315.
- Hofgen, R., Kreft, O., Willmitzer, L. y Hesse, H.** (2001). Manipulation of thiol contents in plants. *Amino Acids* **20**: 291-299.
- Hohnjec, N., Perlick, A.M., Puhler, A. y Kuster, H.** (2003). The *Medicago truncatula* sucrose synthase gene MtSucS1 is activated both in the infected region of root nodules and in the cortex of roots colonized by arbuscular mycorrhizal fungi. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **16**: 903-915.
- Hood, E.E., Gelvin, S.B., Melchers, L.S., y Hoekema, A.** (1993). New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plant. *Transgenic Research* **2**: 201-218.
- Horemans, N., Asard, H. y Caubergs, R.J.** (1994). The role of ascorbate free radical as an electron acceptor to cytochrome b-mediated trans-plasma membrane electron transport in higher plants. *Plant Physiology* **104**: 1455-1458.
- Horvath, B., Bachem, C.W.B., Schelkl, J., y Kondorosi, A.** (1987). Host-specific regulation of nodulation genes in *Rhizobium* is mediated by a okabt-signal interacting with the *nodD* gene product. *EMBO Journal* **6**: 841-848.
- Hosie A.H., Allaway, D., Jones, M.A., Walshaw, D.L., Johnston, A.W. y Poole, P.S.** (2001). Solute-binding protein-dependent ABC transporters are responsible for solute efflux in addition to solute uptake. *Molecular Microbiology* **40**: 1449-1459.
- Hosie, A.H.F., Allaway, D., Dunsby, H.A., Galloway, C.S. y Poole, P.S.** (2002). *Rhizobium leguminosarum* has a second general amino acid permease with unusually broad substrate specificity and high similarity to branched-chain amino acid transporters (Bra/LIV) of the ABC family. *Journal of Bacteriology* **184**: 4071-4080.
- Hossain, M.A. y Asada, K.** (1984). Purification of dehydroascorbate reductase from spinach and its characterization as a thiol enzyme. *Plant and Cell Physiology* **25**: 85-92.



**Hossain, M.A. y Asada, K.** (1985). Monodehydroascorbate reductase from cucumber is a flavin adenine dinucleotide enzyme. *Journal of Biological Chemistry* **260**: 12920-12926.

**Hossain, M.A., Nakano, Y. y Asada, K.** (1984). Monodehydroascorbate reductase in spinach chloroplast and its participation in regeneration of ascorbate for scavenging of hydrogen peroxide. *Plant and Cell Physiol* **25**: 385-395.

**Hou, W.C., Wang, Y.T., Lin, Y.H., Hsiao, L.J., Chen, T.E., Wang, C.W. y Dai, H.** (2000). A complex containing both trypsin inhibitor and dehydroascorbate reductase activities isolated from mitochondria of etiolated mung bean (*Vigna radiata* L. (Wilczek) cv. Tainan n° 5 seedlings. *Journal of Experimental Botany* **51**: 713-719.

**Howitt, S.M. y Udvardi, M.K.** (2000). Structure, function and regulation of ammonium transporters in plants. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes* **1465**: 152-170.

**Howitt, S.M., Udvardi, M.K., Day, D.A. y Gresshoff, P.M.** (1986). Ammonia transport in free-living and symbiotic *Rhizobium* sp. ANU289. *Journal of General Microbiology* **132**: 257-261.

**Huckelhoven, R. y Kogel, K.H.** (2003). Reactive oxygen intermediates in plant microbe interactions: who is who in powdery mildew resistance. *Planta* **216**: 891-902.

**Hückelhoven, R., Fiodor, J., Preis, C. y Kogel, K.H.** (1999). Hypersensitive cell death and papilla formation in barley attacked by the powdery mildew fungus are associated with hydrogen peroxide but not with salicylic acid accumulation. *Plant Physiology* **119**: 1251-1260.

**Hunt, S. y Layzell, D.B.** (1993). Gas-exchange of legume nodules and the regulation of nitrogenase activity. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **44**: 483-511.

**Iannetta, P.P.M., James, E.K., Sprent, J.I. y Minchin, F.R.** (1995). Time-course of changes involved in the operation of the oxygen diffusion barrier in white lupin nodules. *Journal of Experimental Botany* **44**: 565-575.

**Ikeda, J., Kobayashi, M. y Takahashi, E.** (1992). Salt stress increases the respiratory cost of nitrogen-fixation. *Soil Science and Plant Nutrition* **38**: 51-56.

**Imssande, J. Y Ralston, E.J.** (1982). Dinitrogen fixation in male-sterile soybeans. *Plant Physiology* **69**: 745-746.

**Ingram, J. y Bartels, D.** (1996). The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annual Review of Plant Biology* **47**: 377-403.

**Ishikawa T, Yoshimura K, Sakai K, Tamoi M, Takeda T, Shigeoka S.** (1998). Molecular characterization and physiological role of a glyoxysome-bound ascorbate peroxidase from spinach. *Plant and Cell Physiology* **39**: 23-34.

- Ishikawa, T., Sakai, K., Takeda, T. y Shigeoka, S.** (1995). Cloning and expression of cDNA encoding a new type of ascorbate peroxidase from spinach. *FEBS Letters* **367**: 28-32.
- Ishikawa, T., Sakai, K., Yoshimura, K., Takeda, T. y Shigeoka, S.** (1996a). cDNAs encoding spinach stromal and thylakoid-bound ascorbate peroxidase, differing in the presence or absence of their 3'-coding regions. *FEBS Letters* **384**: 289-293.
- Ishikawa, T., Takeda, T. y Shigeoka, S.** (1996b). Purification and characterization of cytosolic ascorbate peroxidase from komatsuna (*Brassica rapa*). *Plant Science* **120**: 11-18.
- Iturbe-Ormaetxe, I., Matamoros, M.A., Rubio, M.C., Dalton, D.A. y Becana, M.** (2001). The antioxidants of legume nodule mitochondria. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **14**: 1189-1196.
- Jackson, C., Dench, J., Moore, A.L., Halliwell, B., Foyer, C.H. y Hall, D.O.** (1978). Subcellular localization and identification of superoxide dismutase in the leaves of higher plants. *European Journal of Biochemistry* **91**: 339-344.
- James, E.K., Sprent, J.I., Hay, G.T. y Minchin, F.R.** (1993). The effect of irradiance on the recovery of soybean nodules from sodium chloride-induced senescence. *Journal of Experimental Botany* **44**: 997-1005.
- Jamet, A., Sigaud, S., Van de Syde, G., Puppo, A. y Herouart, D.** (2003). Expression of the bacterial catalase genes during *Sinorhizobium meliloti*-*medicago sativa* symbiosis and their crucial role during the infection process. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **16**: 217-225.
- Jarvis, B.D.W., Van Berkum, P., Chen, W.X., Nour, S.M., Fernandez M.P., Cleyet-Marel J.C. y Gillis, M.** (1997). Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **47**: 895-898.
- Jebara, S., Jebara, M., Limam, F. y Aouani, M.E.** (2005). Changes in ascorbate peroxidase, catalase, guaiacol peroxidase and superoxide dismutase activities in common bean (*Phaseolus vulgaris*) nodules under salt stress. *Journal of Plant Physiology* **162**: 929-936.
- Jefferson, R.A.** (1987). Assaying chimeric genes in plants: the *GUS* gene fusion system. *Plant Molecular Biology Reports* **5**: 387-405.
- Jia, W.S., Wang, Y.Q., Zhang, S.Q. y Zhang, J.H.** (2002). Salt-stress-induced ABA accumulation is more sensitively triggered in roots than in shoots. *Journal of Experimental Botany* **53**: 2201-2206.
- Jiang, M. y Zhang J.** (2002). Water stress-induced abscisic acid accumulation triggers the increased generation of reactive oxygen species and up-regulates the activities of antioxidant enzymes in maize leaves. *Journal of Experimental Botany* **53**: 2401-2410.



- Jiménez A, Hernández, J.A, Del Rio, L.A. y Sevilla, F.** (1997). Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. *Plant Physiology* **114**: 275-284.
- Jiménez-Zurdo, J.I., Frugier, F., Crespi, M.D. y Kondorosi, A.** (2000). Expression profiles of 22 novel molecular markers for organogenetic pathways acting in alfalfa nodule development. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **13**: 96-106.
- Jones, D.K., Dalton, D.A., Rosell, F.I. y Raven, E.L.** (1998). Class I heme peroxidases: Characterization of soybean ascorbate peroxidase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **360**: 173-178.
- Jones, J.D.G., Shlumukov, L., Carland, F., English, J., Scofield, S.R., Bishop, G.J. y Harrison, K.** (1992). Effective vectors for transformation, expression of heterologous genes, and assaying transposon excision in transgenic plants. *Transgenic Research* **1**: 285-297.
- Joo, B.H., Bae, Y.S. y Lee, J.S.** (2001). Role of auxin induced reactive oxygen species in root gravitropism. *Plant Physiology* **126**: 1055-1060.
- Jordan, D.C.** (1982). Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. *International Journal of Systematic Bacteriology* **32**: 136-139.
- Jouanneau, Y., Richaud, P. y Grabau, C.** (1990). The nucleotide sequence of a flavodoxin-like gene which precedes two ferredoxin genes in *Rhodobacter capsulatus*. *Nucleic Acids Research* **18**: 5284.
- Jouanneau, Y., Meyer, C., Gaillard, J. y Vignais, P.M.** (1990). Purification and characterization of a 7Fe-ferredoxin from *Rhodobacter-capsulatus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **171**: 273-279.
- Jourand, P., Giraud, E., Bena, G., Sy, A., Willems, A., Gillis, M., Dreyfus, B. y de Lajudie, P.** (2004). *Methylobacterium nodulans* sp. nov., for a group of aerobic, facultatively methylotrophic, legume root-nodule-forming and nitrogen-fixing bacteria. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **54**: 2269-2273.
- Ju, G.C., Li, X.Z., Rauser, W.E. y Oaks, A.** (1997). Influence of cadmium on the production of gamma-glutamylcysteine peptides and enzymes of nitrogen assimilation in *Zea mays* seedlings. *Physiologia Plantarum* **101**: 793-799.
- Kamate, K., Rodriguez-Llorente, I.D., Scholte, M., Durand, P., Ratet, P., Kondorosi, E., Kondorosi, A. y Trinh, T.H.** (2000). Transformation of floral organs with GFP in *Medicago truncatula*. *Plant Cell Reports* **19**: 647-653.
- Kaneko, Y. y Newcomb, E.H.** (1987). Cytochemical localization of uricase and catalase in developing root nodules of soybean. *Protoplasma* **140**: 1-12.
- Kanematsu, S. y Asada, K.** (1979). Ferric and manganic superoxide dismutases in *Euglena gracilis*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **195**: 535-545.

- Kanematsu, S. y Asada, K.** (1990). Characteristic amino acid sequences of chloroplast and cytosol isozymes of CuZn-superoxide dismutase in spinach, rice, and horsetail. *Plant Cell Physiology* **31**: 99-112.
- Kape, R., Parniske, M. y Werner, D.** (1991). Chemotaxis and nod gene activity of *Bradyrhizobium japonicum* in response to hydroxycinnamic acids and isoflavonoids. *Applied Environmental and Microbiology* **57**: 316-319.
- Kardailsky, I.V. y Brewin, N.J.** (1996). Expression of cysteine protease genes in pea nodule development and senescence. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **81**: 689-695.
- Karns, J.** (1999). Gene sequence and properties of an s-triazine ring-cleavage enzyme from *Pseudomonas* sp. strain NRRLB-12227. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 3512-3517.
- Kato, Y., Urano, J., Maki, Y. y Ushimaru, T.** (1997). Purification and characterization of dehydroascorbate reductase from rice. *Plant and Cell Physiology* **38**: 173-178.
- Katsuhara, M., Otsuka, Y. y Ezaki, B.** (2005). Salt stress-induced lipid peroxidation is reduced by glutathione S-transferase, but this reduction of lipid peroxides is not enough for a recovery of root growth in Arabidopsis. *Plant Science* **169**: 369-373.
- Katz, I., Green, M., Ruskol, Y. y Dosoretz, C.** (2000). Characterization of atrazine degradation and nitrate reduction by *Pseudomonas* sp. strain ADP. *Water Research* **4**: 219-224.
- Kaur, K. y Singh, R.** (1999). Sugar metabolism and partitioning in cytosol and bacteroid fractions of chickpea nodules. *Plant Physiology and Biochemistry* **37**: 685-692.
- Keegstra, K. y Cline, K.** (1999). Protein import and routing systems of chloroplasts. *Plant Cell* **11**: 557-570.
- Keen, N.T., Tamaki, S., Kobayashi, D. y Trollinger, D.** (1988). Improved broad-host-range plasmids for DNA cloning in gram-negative bacteria. *Gene* **70**: 191-197.
- Kennedy, I.R.** (1966a). Primary products of symbiotic nitrogen fixation .I. Short-term exposures of *Serradella* nodules to  $^{15}\text{N}_2$ . *Biochimica et Biophysica Acta* **130**: 285-294.
- Kennedy, I.R.** (1966b). Primary products of symbiotic nitrogen fixation .II. Pulse labelling of *Serradella* nodules to  $^{15}\text{N}_2$ . *Biochimica et Biophysica Acta* **130**: 294-303.
- Keyer, K., Gort, A.S. y Imlay, J.A.** (1995). Superoxide and the production of oxidative DNA damage. *Journal of Bacteriology* **177**: 6782-6790.
- Khadri, M., Pliego, L., Soussi, M., Lluch, C. y Ocaña, A.** (2001). Ammonium assimilation and ureide metabolism in common bean (*Phaseolus vulgaris*) nodules under salt stress. *Agronomie* **21**: 635-643.



- Khailova, G.F. y Larkova, T.P.** (1992). Effect of chloride salinity on formation and activity of the symbiotic system in alfalfa. *Soviet Plant Physiology* **39**: 205-210.
- Kiddle, G., Pastori, G.M., Bernard, S., Pignocchi, C., Antoniow, J., Verrier, P.J. y Foyer, C.H.** (2003). Effects of leaf ascorbate content on defense and photosynthesis gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Antioxidants and Redox Signaling* **5**: 23-32.
- Kieselbach, T., Bystedt, M., Hynds, P., Robinson, C. y Schröder, W.P.** (2000). A peroxidase homologue and novel plastocyanin located by proteomics to the *Arabidopsis* chloroplast thylakoid lumen. *FEBS Letters* **480**: 271-276.
- Kimata, Y. y Theil, E.C.** (1994). Posttranscriptional regulation of ferritin during nodule development in soybean. *Plant Physiology* **104**: 263-270.
- King, B.J., Layzell, D.B. y Canvin, D.T.** (1986). The role of dark carbon-dioxide fixation in root-nodules of soybean. *Plant Physiology* **81**: 200-205.
- Kirby, T.W., Lancaster, Jr.J.R. y Fridovich, I.** (1981). Isolation and characterization of the iron-containing superoxide dismutase of *Methanobacterium bryantii*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **210**: 140-148.
- Kleczkowski, L.A.** (1996). Back to the drawing board: Redefining starch synthesis in cereals. *Trends in Plant Science* **1**: 363-364.
- Klugkist, J., Haaker, H. y Veeger, C.** (1986a). Studies on the mechanism of electron transport to nitrogenase in *Azotobacter vinelandii*. *European Journal of Biochemistry* **155**: 41-46.
- Klugkist, J., Voorberg, J., Haaker, H. y Veeger, C.** (1986b) Characterization of three different flavodoxins from *Azotobacter vinelandii*. *European Journal of Biochemistry* **155**: 33-40.
- Knauf, N.T. y Nester, E.W.** (1982). Wide host range cloning vectors: a cosmid clone bank of an *Agrobacterium* Ti plasmid. *Plasmid* **8**: 45-54.
- Knight, E. Jr., D'Eustachio, A.J. y Hardy, R.W.F.** (1966). A flavoprotein with ferredoxin activity from *Clostridium pasteurianum*. *Biochimica et Biophysica Acta* **113**: 626-628.
- Knight, H. y Knight, M.R.** (2001). Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross-talk. *Trends in Plants Science* **6**: 262-267.
- Ko, M.P., Huang, P.Y., Huang, J.S. y Baker, K.R.** (1985). Accumulation of phytoferritin and starch granules in developing nodules of soybean roots infected with *Heterodera glycines*. *Phytopathology* **75**: 159-164.
- Ko, M.P., Huang, P.Y., Huang, J.S. y Baker, K.R.** (1987). The occurrence of phytoferritin and its relationship to effectiveness of soybean nodules. *Plant Physiology* **83**: 299-305.

- Kobayashi, K. y Tagawa, S.** (1999). Isolation of reductase for SoxR that governs an oxidative response regulon from *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* **451**: 227-230.
- Kondorosi, E., Trinh, H., Roudier, F., Foucher, F., Vaubert, D., Cebolla, A., Lodeiro, A., Fehér, A., Keleman, Z., Gyögyey, J., Mergaert, P., Kereszt, A., Dudits, D., Hirt, H. y Kondorosi, A.** (1998). Nod factor-induces cycle activation in root cortical cells. *Biological Nitrogen Fixation for the 21<sup>st</sup> century*. Elmerich *et al.*, Eds. Kluwer Academics Publishers, The Netherlands, pp 189.
- Kornyeyev, D., Logan, B.A., Allen, R.D. y Holaday, A.S.** (2003). Effect of chloroplastic overproduction of ascorbate peroxidase on photosynthesis and photoprotection in cotton leaves subjected to low temperature photoinhibition. *Plant Science* **165**: 1033-1041.
- Kovalchuk, I., Bojko, V., Kovalchuk, O., Gloeckler, V., Filkowski, J., Heinlein, M. y Hohn, B.** (2003). Pathogen induced systemic plant signal triggers genome instability. *Nature* **423**: 760-762.
- Kreps, J.A., Wu, Y., Chang, H.S., Zhu, T., Wang, X. y Harper, J.F.** (2002). Transcriptome changes for Arabidopsis in response to salt, osmotic, and cold stress. *Plant Physiology* **130**: 2129-2141.
- Krieger-Liszkay, A.** (2005). Singlet oxygen production in photosynthesis. *Journal of Experimental Botany* **56**: 337-346.
- Kruk, J. Schmid, G.H. y Strzalka, K.** (2000). Interaction of  $\alpha$ -tocopherol quinone,  $\alpha$ -tocopherol and other prenyllipids with photosystem II. *Plant Physiology and Biochemistry* **38**: 271-277.
- Kruk, J. y Strzalka, K.** (2001). Redox changes of cytochrome b559 in the presence of plastoquinones. *Journal of Biological Chemistry* **276**: 86-91.
- Kubo A., Sano, T., Saji, H., Tanaka, K., Kondo, N. y Tanaka, K.** (1993). Primary structure and properties of glutathione reductase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant and cell Physiology* **34**: 1259-1266.
- Kusunose, E., Ichihara, K., Noda, Y. y Kusunose, M.** (1976). Superoxide dismutase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Biochemistry* **80**: 1343-1352.
- Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lahiri, K., Chattopadhyay, S., Chatterjee, S. y Ghosh, B.** (1992). Polyamine metabolism in nodules of *Vigna mungo* during senescence. *Phytochemistry* **31**: 4087-4090.
- Lahiri, K., Chattopadhyay, S., Chatterjee, S. y Ghosh, B.** (1993). Biochemical changes in nodules of *Vigna mungo* (L.) during vegetative and reproductive stages of plant growth in the field. *Annals of Botany* **71**: 845-848.



- Lahiri, K., Chattopadhyay, S., Chatterjee, S. y Ghosh, B.** (2004). Correlation of endogenous free polyamine levels with root nodule senescence in different genotypes in *Vigna mungo* L. *Journal of Plant Physiology* **161**: 563-571.
- Lakshmi-Kumari, M., Singh, C.S. y Rao, N.S.S.** (1974). Root hair infection and nodulation in lucerne (*Medicago-sativa* L.) as influenced by salinity and alkalinity. *Plant and Soil* **40**: 261-268.
- Lang, P.** (1990). Efecto del nitrato sobre la fijación de Nitrógeno y sobre el metabolismo del carbono en nódulos de *Lupinus albus* L. cv. Multolupa. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad Autonoma de Madrid.
- Lang, P., Martin, R. y Golvano, M.P.** (1993). Effect of nitrate on carbon metabolism and nitrogen-fixation in root-nodules of lupinus-albus. *Plant Physiology and Biochemistry* **31**: 639-648.
- Laudenbach, D.E., Reith, M.E. y Straus N.A.** (1988). Isolation, sequence analysis, and transcriptional studies of the flavodoxin gene from *Anacystis nidulans* R2. *Journal of Bacteriology* **170**: 258-265.
- Lauter, D.J., Munns, D.N. y Clarkin, K.L.** (1981). Salt response of chickpea as influenced by n-supply. *Agronomy Journal* **73**: 961-966.
- Le Gouil, C., Parent, J.L., Rola-Pleszczynski, M. y Stankova, J.** (1994). Analysis of recombinant plasmids by a modified alkaline lysis method. *Analytical Biochemistry* **219**: 164.
- Lee, J.W., Zhang, Y.X., Weaver, C.D., Shomer, N.H., Louis, C.F. y Roberts, D.M.** (1995). Phosphorylation of nodulin 26 on serine 262 affects its voltage-sensitive channel activity in planar lipid bilayers. *Journal of Biological Chemistry* **270**: 27051-27057.
- Leonhardt, K.G. y Straus, N.A.** (1989). Sequence of the flavodoxin gene from *Anabaena variabilis* 7120. *Nucleic Acids Research* **17**: 4384.
- Lewis, G.P., Schrire, B.D., Mackinder, B.A. y Lock, J.M.** (2003). *Legumes of the World*. Eds. Royal Botanic Gardens, Kew, UK.
- Ling, L-S. y Varner, J.E.** (1991). Expresión of ascorbic acid oxidase in zucchini squash (*Cucurbita pepo* L.). *Plant Physiology* **96**: 159-165.
- Liochev, S.I., Hausladen, A., Beyer, W.F. Jr. y Fridovich, I.** (1994). NADPH: ferredoxin oxidoreductase acts as a paraquat diaphorase and is a member of the soxRS regulon. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **91**: 1328-1331.
- Lloret, J., Bolaños, L., Lucas, M.M., Peart, J.M., Brewin, N.J., Bonilla, I. y Rivilla, R.** (1995). Ionic stress and osmotic-pressure induce different alterations in the lipopolysaccharide of a *Rhizobium-meliloti* strain. *Applied And Environmental Microbiology* **61**: 3701-3704.

- Lluch, C. y Ocaña, A.** (1997). Boletín de la Sociedad Española de Fisiología Vegetal **27**: 8.
- Lobreaux, S. Hardy, T. y Briat, J.F.** (1993). Absciscic acid is involved in the iron-induced synthesis of maize ferritin. *EMBO Journal* **12**: 651-617.
- Lobreaux, S. y Briat, J.F.** (1991). Ferritin accumulation and degradation in different organs of pea (*Pisum sativum*) during development. *Biochemical Journal* **274**: 601-606.
- Lodwig, E. y Poole, P.** (2003). Metabolism of *Rhizobium* bacteroids. *Critical Reviews in Plant Sciences* **22**: 37-78.
- Lodwig, E.M., Hosie, A.H., Bourdes, A., Findlay, K., Allaway, D., Karunakaran, R., Downie, J.A. y Poole, P.S.** (2003). Amino-acid cycling drives nitrogen fixation in the legume-Rhizobium symbiosis. *Nature* **422**: 722-726.
- Long, S.R.** (2001). Genes and signals in the rhizobium-legume symbiosis. *Plant Physiology* **125**: 69-72.
- López-Huertas, E., Corpas, F.J., Sandalio, L.M. y del Río, L.A.** (1999). Characterization of membrane polypeptides from pea leaf peroxisomes involved in superoxide radical generation. *Biochemical Journal* **337**: 531-536.
- Lotocka, B., Kopcinska, J. y Golinowski, W.** (1998). Morphogenesis of root nodules in white clover. II. The effect of mutation in genes nod II of the microsymbiont upon the nodule structure. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* **67**: 5-22.
- Low, I.E., Eaton, M.D. y Proctor, P.** (1968). Relation of catalase to substrate utilization by *Mycoplasma pneumoniae*. *Journal of Bacteriology* **95**: 1425-1430.
- Lucas, M.M., Van de Sype, G. Hérouart, D., Hernández, M.J., Puppo, A. y de Felipe, M.R.** (1998). Immunolocalization of ferritin in determinate and indeterminate legume root nodules. *Protoplasma* **204**: 61-70.
- Lucas-García, J.A., Schlöter, M., Durkaya, T., Hartmann, A. y Gutierrez-Mañero, J.** (2003). Colonization of pepper roots by a plant growth promoting *Pseudomonas fluorescens* strain. *Biology and Fertility of Soils* **37**: 381-385.
- Lynch, D.V. y Thompson, J.E.** (1984). Lipoxygenase-mediated production of superoxide anion in senescing plant tissue. *FEBS Letters* **173**: 251-254.
- Ma, L. y Selim, H.** (1996). Atrazine retention and transport in soils. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* **145**: 129-173.
- Madhavi, B., Anand, C.S., Bharathi, A. y Polasa, H.** (1993). Effect of pesticides on growth of rhizobia and their host plants during symbiosis. *Biomedical and Environmental Sciences* **6**: 89-94.
- Mahan, J.R. y Burke, J.J.** (1987). Purification and characterization of glutathione-reductase from corn mesophyll chloroplasts. *Physiologia Plantarum* **71**: 352-358.



**Maldonado, S., Lostao, A., Irun, M.P., Fernandez-Recio, J., Gustavo Genzor, C., Begona Gonzalez, E., Rubio, J.A., Luquita, A., Daoudi, F. y Sancho, J. (1998).** Apoflavodoxin: structure, stability, and FMN binding. *Biochemie* **80**: 813-820.

**Malik, N.S.A., Pfeiffer, N.E., Williams, D.R. y Wagner, F.W. (1981).** Peptidohydrolases of soybean root nodules. Identification, separation and partial characterization of enzymes from bacteroid-free extracts. *Plant Physiology* **68**: 386-392.

**Mallik, M.A.B. y Tesfai, K. (1985).** Pesticidal effect on soybean-rhizobia symbiosis. *Plant and Soil* **85**: 33-41.

**Mandelbaum, R., Allan, D. y Wackett, L. (1995).** Isolation and characterization of a *Pseudomonas* sp. that mineralizes the s-triazine herbicide atrazine. *Applied and Environmental Microbiology* **61**: 1451-1457.

**Mandelbaum, R.T., Wackett, L.P. y Allan, D.I. (1993).** Rapid hydrolysis of atrazine to hydroxyatrazine by soil bacteria. *Environmental Science and Technology* **27**: 1943-1946.

**Mann, T., y Kleilin, D. (1938).** Homocuprein and heptacuprein, copper-protein compounds of blood and liver in mammals. *Proceedings of the Royal Society of London B* **126**: 303-315.

**Marrs KA. (1996).** The functions and regulation of glutathione s-transferases in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **47**: 127-158.

**Martinez, B., Tomkins, J., Wackett, L., Wing, R. y Sadowsky, M. (2001).** Complete nucleotide sequence and organization of the atrazine catabolic plasmid pADP-1 from *Pseudomonas* sp. ADP. *Journal of Bacteriology* **183**: 5684-5697.

**Martínez-Molina, E. y Olivares, J. (1982).** A note on evidence for involvement of pectolytic enzymes in the infection process of *Medicago sativa* by *Rhizobium meliloti*. *Journal of Applied Bacteriology* **52**: 453.

**Mashepohl, B., Witty, J.F., Riedel, K.U., Klipp, W. y Puhler, A. (1993).** *Rhizobium meliloti* mutants defective in symbiotic nitrogen fixation affect the oxygen gradient in alfalfa (*Medicago sativa*) root nodules. *Journal of Experimental Botany* **44**: 419-426.

**Matamoros, M.A., Baird, L.M., Escuredo, P.R., Dalton, D.A., Minchin, F.R., Iturbe-Ormaetxe, I., Rubio, M.C., Moran, J.F., Gordon, A.J. y Becana, M. (1999a).** Stress-induced legume root nodule senescence: Physiological, biochemical and structural alterations. *Plant Physiology* **121**: 97-111.

**Matamoros, M.A., Dalton, D.A., Ramos, J., Clemente, M.R., Rubio, M.C. y Becana, M. (2003).** Biochemistry and molecular biology of antioxidants in the rhizobia-legume symbiosis. *Plant Physiology* **133**: 499-509.

**Matamoros, M.A., Moran, J.F., Iturbe-Ormaetxe, I., Rubio, M.C. y Becana, M. (1999b).** Glutathione and homoglutathione synthesis in legume root nodules. *Plant Physiology* **121**: 879-888.

**Mathesius U, Charon C, Rolfe BG, Kondorosi A, Crespi M.** (2000). Temporal and spatial order of events during the induction of cortical cell divisions in white clover by *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* inoculation or localized cytokinin addition. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **13**: 617-628.

**Mathis, P. y Kleo, J.** (1973). The triplet state of  $\beta$ -carotene and of analog polyenes of different length. *Photochemistry and Photobiology* **18**: 343-346.

**Matsumura, T., Tabayashi, N., Kamagata, Y., Souma, C. y Saruyama, H.** (2002). Wheat catalase expressed in transgenic rice can improve tolerance against low temperature stress. *Physiologia Plantarum* **116**: 317-327.

**Maurel, C.** (1997). Aquaporins and water permeability of plant membranes. *Annual Review of Plant Biology* **48**: 399-429.

**Maxwell, D.P., Wang, Y. y McIntosh, L.** (1999). The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **96**: 8271-8276.

**Mazurowa, H., Ratajczak, L. y Garneczarska, M.** (1991). Alcohol dehydrogenase and its relation to respiratory pathways in lupine root nodules. *Acta Biochimica Polonica* **38**: 37-41.

**McCord, J.M. y Fridovich, I.** (1969). Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *The Journal of Biological Chemistry* **244**: 1155-1163.

**McKersie, B.D., Bowley, S.R. y Jones, K.S.** (1999). Winter survival of transgenic alfalfa overexpressing superoxide dismutase. *Plant Physiology* **119**: 839-847.

**McKersie, B.D., Bowley, S.R., Harjanto, E. y Leprince, O.** (1996). Water-Deficit Tolerance and Field Performance of Transgenic Alfalfa Overexpressing Superoxide Dismutase. *Plant Physiology* **111**: 1177-1181.

**McKersie, B.D., Chen, Y., de Beus, M., Bowley, S.R., Bowler, C., Inze, D., D'Halluin, K. y Botterman, J.** (1993). Superoxide dismutase enhances tolerance of freezing stress in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiology* **103**: 1155-1163.

**McKersie, B.D., Murnaghan, J., Jones, K.S. y Bowley, S.R.** (2000). Iron-superoxide dismutase expression in transgenic alfalfa increases winter survival without a detectable increase in photosynthetic oxidative stress tolerance. *Plant Physiology* **122**: 1427-1437.

**McKhann, H.I. y Hirsch, A.M.** (1994). Does *Rhizobium* avoid the host response? *Current Topics in Microbiology and Immunology* **192**: 139-162.

**Mehlhorn H, Lelandais M, Korth HG, Foyer CH.** (1996). Ascorbate is the natural substrate for plant peroxidases. *FEBS Letters* **378**: 203-206.

**Meister, A.** (1994). Glutathione-ascorbic acid antioxidant system in animals. *Journal of Biological Chemistry* **269**: 9397-9400.



- Mendel, R.R. y Schwarz, G.** (1999). Molybdoenzymes and molybdenum cofactor in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* **18**: 33-69.
- Meyer, R.J.** (1979). Expression of incompatibility by derivatives of the broad host-range inc P-1 plasmid RK2. *Molecular and General Genetics* **177**: 155-61.
- Mhadhbi, H., Jebara, M., Limam, F. y Aouani, M.E.** (2004). Rhizobial strain involvement in plant growth, nodule protein composition and antioxidant enzyme activities of chickpea-rhizobia symbioses: modulation by salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry* **42**: 717-722.
- Minami, E., Kouchi, H., Carlson, R.W., Cohn, J.R., Kolli, V.K., Day, R.B., Ogawa, T. y Stacey, G.** (1996). Cooperative action of lipo-chitin nodulation signals on the induction of the early nodulin, ENOD2, in soybean roots. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **9**: 574-583.
- Minchin, F.R., Witty, J.F., Sheehy, J.E. y Müller, M.** (1983). A major error in the acetylene reduction assay: decreases in nodular nitrogenase activity under assay conditions. *Journal of Experimental Botany* **34**: 641.
- Mithofer, A.** (2002). Suppression of plant defence in rhizobia-legume symbiosis. *Trends in Plant Science* **7**: 440-444.
- Mithofer, A., Schulze, B. y Boland, W.** (2004). Biotic and heavy metal stress response in plants: evidence for common signals. *FEBS Letters* **566**: 1-5.
- Mitsuhara, I., Malik, K.A., Miura, M. y Ohashi, Y.** (1999). Animal cell-death suppressors Bcl-x(L) and Ced-9 inhibit cell death in tobacco plants. *Current Biology* **9**: 775-778.
- Mittler, R.** (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* **7**: 405-410.
- Mittler, R., Merquiol, E., Hallak-Herr, E., Rachmilevitch, S., Kaplan, A. y Cohen M.** (2001). Living under a "dormant" canopy: a molecular acclimation mechanism of the desert plant *Retama raetam*. *Plant Journal* **25**: 407-416.
- Mittova, V., Tal, M., Volokita, M. y Guy, M.** (2003). Up-regulation of the leaf mitochondrial and peroxisomal antioxidative systems in response to salt-induced oxidative stress in the wild salt-tolerant tomato species *Lycopersicon pennellii*. *Plant Cell and Environment* **6**: 845-856.
- Miyake, C. y Asada, K.** (1992). Thylakoid-bound ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts and photoregeneration of its primary oxidation product monodehydroascorbate radicals in thylakoids. *Plant and Cell Physiology* **33**: 541-553.
- Miyake, C., Cao, W-H. y Asada, K.** (1993). Purification and molecular properties of thylakoid-bound ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology* **34**: 423-430.

- Mohammad, M., Campbell, W.F. y Rumbaugh, M.D.** (1989). Acetylene reduction in salt-tolerance alfalfa and *Rhizobium*. *Arid Soil Research and Rehabilitation* **3**: 469-476.
- Mohammad, R.M., Akhavankharazian, M., Campbell, W.F. y Rumbaugh, M.D.** (1991). Identification of salt-tolerant and drought-tolerant *Rhizobium-meliloti* L strains. *Plant and Soil* **134**: 271-276.
- Moran, J.F., Iturbe-Ormaetxe, I., Matamoros, M.A., Rubio, M.C., Clemente, M.R., Brewin, N.J. y Becana, M.** (2000). Glutathione and homoglutathione synthetases of legume nodules. Cloning, expression, and subcellular localization. *Plant Physiology* **124**: 1381-1392.
- Moran, J.F., James, E.K., Rubio, M.C., Sarta, G., Klucas, R.V. y Becana, M.** (2003). Functional characterization and expresión of a cytosolic iron-superoxide dismutase from cowpea (*Vigna unguiculata*) root nodules. *Plant Physiology* **133**: 773-782.
- Moran, J.F., Klucas, R.V., Grayer, R.J. Abian, J. y Becana, M.** (1997). Complexes of iron with phenolic compounds from soybean nodules and other legume tissues: Prooxidant and antioxidant properties. *Free Radical Biology and Medicine* **22**: 861-870.
- Morder, W., Barry, C.S., Tauriainen, A.A., Betz, C., Tuomainen, J., Utriainen, M., Grierson, D., Sandermann, H., Langebartels, C. y Kangasjärvi, J.** (2002). Ethylene synthesis regulated by biphasic induction of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase and 1- aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase is required for hydrogen peroxide accumulation and cell death in ozone-exposed tomato. *Plant Physiology* **130**: 1918-1926.
- Morel, M. y Copeland, L.** (1985). Sucrose synthase of soybean nodules. *Plant Physiology* **78**: 149-154.
- Morell, S., Follmann, H., de Tullio, M. y Haberlein, I.** (1997). Dehydroascorbate and dehydroascorbate reductase are phantom indicators of oxidative stress in plants. *FEBS Letters* **414**: 567-570.
- Morell, S., Follmann, H., de Tullio, M., Haberlein, I.** (1998). Dehydroascorbate reduction: the phantom remaining. *FEBS Letters* **425**: 530-531.
- Moulin, L., Munive, A., Dreyfus, B. y Boivin-Masson, C.** (2001). Nodulation of legumes by members of the beta-subclass of Proteobacteria. *Nature* **411**: 948-950.
- Mouritzen, P. y Rosendahl, L.** (1997). Identification of a transport mechanism for  $\text{NH}_4^+$  in the symbiosome membrana of pea root nodules. *Plant Physiology* **115**: 519-526.
- Mrema, A.F., Granhall, U. y SennerbyForsse, L.** (1997). Plant growth, leaf water potential, nitrogenase activity and nodule anatomy in *Leucaena leucocephala* as affected by water stress and nitrogen availability. *Trees-Structure and Function* **12**: 42-48.



- Müller, J., Wiemken, A. y Boller, T.** (2001). Redifferentiation of bacteria isolated from *Lotus japonicus* root nodules colonized by *Rhizobium* sp. NGR234. *Journal of Experimental Botany* **52**: 2181-2186.
- Muller, P., Klaucke, A. y Wegel, E.** (1995). Tnphoa-induced symbiotic mutants of *Bradyrhizobium-japonicum* that impair cell and tissue differentiation in *Glycine-max*. *Planta* **197**: 163-175.
- Mullineaux, P. y Karpinski, S.** (2002). Signal transduction in response to excess light: getting out of the chloroplast. *Current Opinion in Plant Biology* **5**: 43-48.
- Munné-Bosch, S.** (2005). The role of  $\alpha$ -tocopherol in plant stress tolerance. *Journal of Plant Physiology* **162**: 743-748.
- Munné-Bosch, S. y Alegre, L.** (2002). The function of tocopherols and tocotrienols in plants. *Critical Review in Plant Science* **21**: 31-57.
- Munné-Bosch, S. y Alegre, L.** (2003). Drought-induced changes in the redox state of  $\alpha$ -tocopherol, ascorbate and the diterpene carnosic acid in chloroplasts of Labiatae species differing in carnosic acid contents. *Plant Physiology* **131**: 1816-1825.
- Munné-Bosch, S. y Peñuelas, J.** (2003). Photo- and antioxidant protection, and a role for salicylic acid during drought and recovery in field-grown *Phillyrea angustifolia* plants. *Planta* **217**: 758-766.
- Munnik, T., Ligterink, W., Meskiene, I.I., Calderini, O., Beyerly, J., Musgrave, A. y Hirt, H.** (1997). Distinct osmo-sensing protein kinase pathways are involved in signalling moderate and severe hyper-osmotic stress. *Plant Journal* **20**: 381-388.
- Murgia, I., Tarantino, D., Vannini, C., Bracale, M., Carravieri, S. y Soave, C.** (2004). *Arabidopsis thaliana* plants overexpressing thylakoidal ascorbate peroxidase show increased resistance to Paraquat-induced photooxidative stress and to nitric oxide-induced cell death. *Plant Journal* **38**: 940-953.
- Naito, Y., Fujie, M., Usami, S., Murooka, Y. y Yamada, T.** (2000). The involvement of a cysteine proteinase in the nodule development in Chinese milk vetch infected with *Mesorhizobium huakuii* subsp. *rengei*. *Plant Physiology* **124**: 1087-1095.
- Nakagawa, T., Izumi, T., Banba, M., Umehara, Y., Kouchi, H., Izui, K. y Hata, S.** (2003). Characterization and expression analysis of genes encoding phosphoenolpyruvate carboxylase and phosphoenolpyruvate carboxylase kinase of *Lotus japonicus*, a model legume. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **16**: 281-288.
- Nakano, Y. y Asada, K.** (1987). Purification of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts: its inactivation in ascorbate-depleted medium and reactivation by monodehydroascorbate radical. *Plant and Cell Physiology* **28**: 131-140.
- Nap, J.P y Bisseling, T.** (1990a). The role of nodulins. *Physiologia Plantarum* **79**: 407-414.

- Nap, J.P y Bisseling, T.** (1990b). Developmental biology of a plant-prokaryote symbiosis: the legume root nodule. *Science* **250**: 948-954.
- Nath, A.K., Ahmed, T., Rana, N.S. y Sharma, D.R.** (2002). Host plant nodule parameters associated with nitrogen fixation efficiency in French bean (*Phaseolus vulgaris* L) cultivars. *Indian Journal of Experimental Biology* **40**: 334-340.
- Navas, P. y Gómez-Díaz, C.** (1995). Ascorbate free radical and its role in growth control. *Protoplasma* **184**: 8-13.
- Neill, S., Desikan, R. y Hancock, J.** (2002). Hydrogen peroxide signalling. *Current Opinion in Plant Biology* **5**: 388-393.
- Nemoto S, Otsuka M, Arakawa N.** (1996). Inhibitory effect of ascorbate on cell growth: relation to catalase activity. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* **42**: 77-85.
- Newcomb, E.H., Sippell, D. y Petterson, R.L.** (1979). The early morphogenesis of *Glycine max* and *Pisum sativum* root nodules. *Canadian Journal of Botany* **57**: 2603-2616.
- Ni, W., Turley, R.B. y Trelease, R.N.** (1990). Characterization of a cDNA encoding cottonseed catalase. *Biochimica and Biophysics Acta* **1049**: 219-222.
- Ni, W., y Trelease, R.N.** (1991). Post-transcriptional regulation of catalase isoenzyme expresión in cotton seeds. *Plant Cell* **3**: 737-744.
- Niebel, A., Heungens, K., Barthels, N., Inzé, D., Van Montagu, M., y Gheysen, G.** (1995). Characterization of a pathogen-induced potato catalase and its systemic expression upon nematode and bacterial infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **8**: 371-378.
- Niehaus, K. y Becker, A.** (1998). The role of microbial surface polysaccharides in the *Rhizobium*-legume interactions. *Subcellular Biochemistry* **29**: 73-116.
- Niehaus, W.G.Jr., y Samuelsson, B.** (1968). Formation of malonaldehyde from phospholipid arachidonate during microsomal lipid peroxidation. *European Journal of Biochemistry* **17**: 126-130.
- Niemietz, C.M. y Tyerman, S.D.** (2000). Channel-mediated permeation of ammonia gas through the peribacteroid membrana of soybean nodules. *FEBS Letters* **465**: 110-114.
- Noctor, G., Arisi, A.C.M., Jouanin, L., Kunert, K.J., Rennenberg, H. y Foyer, C.H.** (1998). Glutathione: biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants. *Journal of Experimental Botany* **49**: 623-647.
- Noctor, N. y Foyer, C.H.** (1998). Ascorbate y glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **49**: 249-279.



- Nogales, J., Campos, R., BenAbdelkhalek, H., Olivares, J., Lluch, C. y Sanjuán, J.** (2002). *Rhizobium tropici* genes involved in free-living salt tolerance are required for the establishment of efficient nitrogen-fixing symbiosis with *Phaseolus vulgaris*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **15**:225-32.
- O'Brian, M.R.** (1996). Heme synthesis in the *Rhizobium*-legume symbiosis: a palette for bacterial and eukaryotic pigments. *Journal of Bacteriology* **178**: 2471-2478.
- O'Hara, G.W., Dilworth, M.J., Boonkerd, N. y Parkpian, P.** (1988). Iron-deficiency specifically limits nodule development in peanut inoculated with *Bradyrhizobium* sp. *New Phytologist* **108**: 51-57.
- Obbard, J.P. y Jones, K.C.** (2001). Measurement of symbiotic nitrogen-fixation in leguminous host-plants grown in heavy metal-contaminated soils amended with sewage sludge. *Environmental Pollut* **111**: 311-20.
- Oberschall, A., Deák, M., Török, K., Sass, L., Vass, I., Kovács, I., Fehér, A., Dudits, D. y Horváth, G.V.** (2000). A novel aldose/aldehyde reductase protects transgenic plants against lipid peroxidation under chemical and drought stresses. *Plant Journal* **24**: 437-446.
- Ogawa, K., Kanematsu, S. y Asada, K.** (1996). Intra- and extra-cellular localization of 'cytosolic' CuZn superoxide dismutase in spinach leaf and hypocotyl. *Plant Cell Physiology* **37**: 790-799.
- Oh, C.J., Lee, H., Kim, H.B. y An, C.S.** (2004). Isolation and characterization of a root nodule-specific cysteine proteinase cDNA from soybean. *Journal of Plant Biology* **47**: 216-220.
- Oldroyd, G.E.D., Engstrom, E.M. y Long, S.R.** (2001). Ethylene inhibits the Nod factor signal transduction pathway of *Medicago truncatula*. *Plant Cell* **13**: 1835-1849.
- Orozco-Cardenas, M. y Ryan, C.A.** (1999). Hydrogen peroxide is generated systemically in plant leaves by wounding and sistemin via the octadecanoid pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **96**: 6653-6657.
- Osborne, C., Chen, L.M. y Matthews, R.G.** (1991) Isolation, cloning, mapping, and nucleotide sequencing of the gene encoding flavodoxin in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **173**: 1729-1737.
- Ouyang, L.J., Whelan, J., Weaver, C.D., Roberts, D.M. y Day, D.A.** (1991). Protein phosphorylation stimulates the rate of malate uptake across the peribacteroid membrane of soybean nodules. *FEBS Letters* **293**: 188-190.
- Ovtsyna, A.O., Schultze, M., Tikhonovich, I.A., Spalink, H.P., Kondorosi, E., Kondorosi, A. y Staehelin, C.** (2000). Nod factors of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* and their fucosylated derivatives stimulate a nod factor cleaving activity in pea roots and are hydrolyzed in vitro by plant chitinases at different rates. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **13**: 799-807.

- Padh, H.** (1990). Cellular functions of ascorbic acid. *Biochemistry and Cell Biology* **68**: 1166-1173.
- Palma, J.M., Sandalio, L.M., Corpas, F.J., Romero-Puertas, M.C., McCarthy, I. y del Rio, L.A.** (2002). Plant proteases, protein degradation, and oxidative stress: role of peroxisomes. *Plant Physiology and Biochemistry* **40**: 521-530.
- Parida, A.K. y Das, A.B.** (2005). Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **60**: 324-349.
- Park, J.H., Feng, Y.C., Ji, P.S., Voice, T.C. y Boyd, S.A.** (2003). Assessment of bioavailability of soil-sorbed atrazine. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 3288-3298.
- Pastor, J., Hernandez, A.J., Prieto, N. y Fernandez-Pascual, M.** (2003). Accumulating behaviour of *Lupinus albus* L. growing in a normal and a decalcified calcic luvisol polluted with Zn. *Journal of Plant Physiology* **160**: 1457-65.
- Pastori, G.M., Kiddle, G., Antoniow, J., Bernard, S., Veljovic-Jovanovic, S., Verrier, P.J., Noctor, G. y Foyer, C.H.** (2003). Leaf vitamin C contents modulate plant defense transcripts and regulate genes that control development through hormone signalling. *Plant Cell* **15**: 939-951.
- Patriarca, E.J., Tate, R., Ferraioli, S. e Iaccarino, M.** (2004). Organogenesis of legume root nodules. *International Review of Cytology* **234**: 201-262.
- Pei, Z.M., Murata, Y., Benning, G., Tomine, S., Klusener, B., Allen, G.J., Grill, E. y Schroeder, J.I.** (2000). Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature* **406**: 731-734.
- Perret, X., Staehelin, C. y Broughton, W.J.** (2000). Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **64**: 180-201.
- Peters, N.K., Frost, J.W. y Long, S.R.** (1986). A plant flavone, luteolin, induces expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. *Science* **233**: 977-980.
- Pfeiffer, N.E., Torres, C.M. y Wagner, F.W.** (1983). Proteolytic activities in soybean root nodules: Activity of host cytosol and bacteroids throughout physiological development and senescence. *Plant Physiology* **71**: 797-802.
- Piffanelli, P., Zhou, F., Casais, C., Orme, J., Jarosch, B., Schaffrath, U., Collins, N.C., Panstruga, R. y Schulze-Lefert, P.** (2002). The barley MLO modulator of defence and cell death is responsive to biotic and abiotic stimuli. *Plant Physiology* **129**: 1076-1085.
- Piutti, S., Semon, E., Landry, D., Hartmann, A., Dousset, S., Lichtfouse, E., Topp, E., Soulas, G. y Martin-Laurent, F.** (2003). Isolation and characterisation of *Nocardioide* sp SP12, an atrazine-degrading bacterial strain possessing the gene *trzN* from bulk- and maize rhizosphere. *FEMS Microbiology Letters* **221**: 111-117.



**Pladys, D. y Rigaud, J.** (1985). Senescent in French-bean nodules. Occurrence of different proteolytic activities. *Physiologia Plantarum* **63**: 43-48.

**Pladys, D. y Vance, C.P.** (1993). Proteolysis during development and senescence of effective and plant gene-controlled ineffective alfalfa nodules. *Plant Physiology* **103**: 379-384.

**Pladys, D., Dimitrijevic, L. y Rigaud, J.** (1991). Localization of a protease in protoplast preparations of infected cells of French bean nodules. *Plant Physiology* **97**: 1174-1180.

**Pliego, L.** (2000). Estudio del metabolismo carbonado en la simbiosis *Phaseolus vulgaris*-*Rhizobium tropici*. Ph.D. Thesis. Universidad de Granada. Granada, España.

**Pocard, J.A., Bernard, T. y Le Rudulier, D.** (1991). Translocation and metabolism of glycine betaine in nodulated alfalfa plants subjected to salt stress. *Physiologia Plantarum* **81**: 95-102.

**Polidoros, A.N., Mylona, P.V. y Scandalios, J.G.** (2001). Transgenic tobacco plants expressing the maize Cat2 gene have altered catalase levels that affect plant-pathogen interactions and resistance to oxidative stress. *Transgenic Research* **10**: 555-569.

**Poole, P.S. y Allaway, D.A.** (2000). Carbon and nitrogen metabolism in *Rhizobium*. *Advances in Microbial Physiology* **43**: 117-163.

**Popov, V.H., Cornish, P.S., Sultana, K. y Morris, E.C.** (2005). Atrazine degradation in soils: the role of microbial communities, atrazine application history, and soil carbon. *Australian Journal of Soil Research* **43**: 861-871.

**Pozueta-Romero, J., Perata, P. y Akazawa, T.** (1999). Sucrose-starch conversion in heterotrophic tissues of plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* **18**: 489-525.

**Prakash, R.K., Hooykass, P.J.J., Nuti, M.P., Lepidi, A.A., Ledebouer, A.M., Juliot, J.S. y Denaire, J.** (1980). Detection, isolation and characterization of large plasmids in *Rhizobium*. Newton W.E., Orme-Johnson W.H. (eds) *Nitrogen fixation, Vol II*. Park Press. Baltimore, Md. 135-136.

**Prell, J., Boesten, B., Poole, P. y Priefer, U.B.** (2002). The *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae* VF39  $\gamma$ -aminobutyrate (GABA) aminotransferase gene (*gabT*) is induced by GABA and highly expressed in bacteroids. *Microbiology* **148**: 615-623.

**Proudhon, D., Wei, J., Briat, J. y Theil, E.C.** (1996). Ferritin gene organization: differences between plants and animals suggest possible kingdom-specific selective constraints. *Journal of Molecular Evolution* **42**: 325-36.

**Puan, K.J., Wang, H., Dairi, T., Kuzuyama, T. y Morita, C.T.** (2005). *fldA* is an essential gene required in the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis. *FEBS Letters* **579**: 3802-3806.

- Puekpe, S.G. y Broughton, W.J.** (1999). *Rhizobium* sp. strain NGR234 and *R. fredii* USDA257 share exceptionally broad, nested host ranges. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **12**: 293-318.
- Pueyo, J.J., Gómez-Moreno, C. y Mayhew, S.G.** (1991). Oxidation-reduction potentials of ferredoxin NADP<sup>+</sup> reductase from *Anabaena* PCC7119 and of their electrostatic and covalent complex. *European Journal of Biochemistry* **202**: 1065-1071.
- Puget, K. y Michelson, A.M.** (1974). Iron containing superoxide dismutases from luminous bacteria. *Biochimie* **56**: 1255-1267.
- Puppo, A. y Halliwell, A.** (1988). Generation of hydroxyl radicals by soybean nodule leghaemoglobin. *Planta* **173**: 405-410.
- Puppo, A., Dimitrijevic, L. y Rigaud, J.** (1982). Possible involvement of nodule superoxide dismutase and catalase in leghemoglobin protection. *Planta* **156**: 374-379.
- Puppo, A., Dimitrijevic, L. y Rigaud, J.** (1987). O<sub>2</sub> consumption and superoxide dismutase content in purified mitochondria from soybean root nodules. *Plant Science* **50**: 3-11.
- Puppo, A., Dimitrijevic, L., Trinchant, J.C. y Rigaud, J.** (1986). Acetylene reduction and superoxide dismutase activities in *Sesbania rostrata* root and stem nodules. *Physiologie végétale* **24**: 689-696.
- Puppo, A., Groten, K., Bastian, F., Carzaniga, R., Soussi, M., Lucas, M.M., de Felipe, M.R., Harrison, J., Vanacker, H. y Foyer, C.H.** (2005). Legume nodule senescent: roles for redox and hormone signalling in the orchestration of the natural aging process. *New Phytologist* **165**: 683-701.
- Puppo, A., Herrada, G. y Rigaud, J.** (1991). Lipid peroxidation in peribacteroid membranes from French bean nodules. *Plant Physiology* **96**: 826-830.
- Radosevich, M. y Tuovinen, O.H.** (2004). Microbial degradation of atrazine in soils, sediments, and surface water. *Pesticide Decontamination and Detoxification ACS Symposium Series* **863**: 129-139.
- Rae, A.L., Bonfante-Fasolo, P. y Brewin, N.J.** (1992). Structure and growth of the infection threads in the legume symbiosis with *Rhizobium leguminosarum*. *Plant Journal* **2**: 385-395.
- Ragland, M. y Theil, E.C.** (1993). Ferritin (mRNA, protein) and iron concentrations during soybean nodule development. *Plant Molecular Biology* **21**: 555-560.
- Ragland, M., Briat, J.F., Gagnon, J., Laulhere, J.P., Massenet, O. y Theil E.C.** (1990). Evidence for conservation of ferritin sequences among plants and animals and for a transit peptide in soybean. *The Journal of Biological Chemistry* **265**: 18339-18344.



- Ralebitso, T.K., Senior, E. y van Verseveld, H.W.** (2002). Microbial aspects of atrazine degradation in natural environments. *Biodegradation* **13**: 11-19.
- Ramos, M.L.G., Parsons, R., Sprent, J.I. y James, E.K.** (2003). Effect of water stress on nitrogen fixation and nodule structure of common bean. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* **38**: 339-347.
- Ramu, S.K., Peng, H.M. y Cook, D.R.** (2002). Nod factor induction of reactive oxygen species production is correlated with expression of the early nodulin gene *rip1* in *Medicago truncatula*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **15**: 522-528.
- Rao, D.L.N., Giller, K.E., Yeo, A.R. y Flowers, T.J.** (2002). The effects of salinity and sodicity upon nodulation and nitrogen fixation in chickpea (*Cicer arietinum*). *Annals of Botany* **89**: 563-570.
- Rao, N.S.S., Singh, C.S., Magu, S.P. y Lakshmik, M.** (1972). Nodulation of lucerne (*Medicago-sativa* L) under influence of sodium-chloride. *Indian Journal of Agricultural Sciences* **42**: 384-386.
- Rao, S.T., Shaffie, F., Yu, C. y Mayhew, S.G.** (1991). Structure of the oxidized log-chain flavodoxin from *Anabaena* 7120 at 2 Å resolution. *Protein Science* **1**: 1413-1427.
- Rawlings, D.E.** (1999). Proteic toxin-antitoxin, bacterial plasmid addiction systems and their evolution with special reference to the *pas* system of pTF-FC2. *FEMS Microbiol. Lett.* **176**: 269-277.
- Razquin, P., Schmitz, S., Fillat, M.F., Peleato, M.L. y Bohme, H.** (1994). Transcriptional and translational analysis of ferredoxin and flavodoxin under iron and nitrogen stress in *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *Journal of Bacteriology* **176**: 7409-11.
- Reddy, C.D. y Venkaiah, B.** (1982). Studies on isoenzymes of superoxide dismutase from mung bean (*Vigna radiata*) seedlings. *Journal of Plant Physiology* **116**: 279-284.
- Reibach, P.H. y Streeter, J.G.** (1993). Evaluation of active versus passive uptake of metabolites by *Rhizobium japonicum* bacteroids. *Journal of Bacteriology* **159**: 47-52.
- Reynolds, E.S.** (1963). The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* **17**: 208-213.
- Rhoades, J.D. y Loveday, J.** (1990). Salinity in irrigated agriculture. American Society of Civil Engineers, Irrigation of Agricultural Crops Eds. Steward, B.A. y Nielsen, D.R., pp. 1089-1142.
- Riccillo, P.M., Muglia, C.I., de Bruijn, F.J., Roe, A.J., Booth, I.R. y Aguilar, O.M.** (2000). Glutathione is involved in environmental stress responses in *Rhizobium tropici*, including acid tolerance. *Journal of Bacteriology* **182**: 1748-1753.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J. y Paganga, G.** (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Sciences* **2**: 152-159.



**Rich, P.R. y Bonner, W.D.Jr.** (1978). The sites of superoxide anion generation in higher plant mitochondria. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **188**: 206-213.

**Riggle, B.D., Wiebold, W.J. y Kenworthy, W.J.** (1984). Effect of photosynthate source-sink manipulation on dinitrogen fixation of male-fertile and male-sterile soybean isolines. *Crop Science* **24**: 5-8.

**Riley, D., Wilkinson, W. y Tucker, B.V.** (1976). Biological unavailability of paraquat residue in soil. Eds. Kaufmann, D.D., Still, G.G., Paulson, G.D. y Bandel, S.K. Bound and Conjugated Pesticide Residues. ACS Symp Series **29**: 301-353.

**Rivas, R., Willems, A., Subba-Rao, N.S., Mateos, P.F., Dazzo, F.B., Kroppenstedt, R.M., Martínez-Molina, E., Gillis, M. y Velásquez, E.** (2003). Description of *Devosia neptuniae* sp. nov. that nodulates and fixes nitrogen in symbiosis with *Neptunia natans*, an aquatic legume from India. *Systematic and applied microbiology* **26**: 47-53.

**Rizhsky, L., Hallak-Herr, E., Van Breusegem, F., Rachmilevitch, S., Barr, J.E., Rodermel, S., Inze, D. y Mittler, R.** Double antisense plants lacking ascorbate peroxidase and catalase are less sensitive to oxidative stress than single antisense plants lacking ascorbate peroxidase or catalase. *Plant Journal* **32**: 329-342.

**Roberts, T.R., Dyson, J.S. y Lane, M.C.G.** (2002). Deactivation of the biological activity of paraquat in the soil environment: a review of long-term environmental fate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**: 3623-3631.

**Robleto, E.A., Kmiecik, K., Oplinger, E.S., Nienhuis, J. y Triplett, E.W.** (1998). Trifolitoxin production increases nodulation competitiveness of *Rhizobium etli* CE3 under agricultural conditions. *Applied and Environmental Microbiology* **64**: 2630-2633.

**Robleto, E.A., Scupham, A.J. y Triplett, E.W.** (1997). Trifolitoxin production in *Rhizobium etli* strain CE3 increases competitiveness for rhizosphere colonization and root nodulation of *Phaseolus vulgaris* in soil. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **10**: 228-233.

**Rodriguez-Llorente, I.D., Pérez-Hormaeche, J., El Mounadi, K., Dary, M., Caviedes, M.A., Cosson, V., Kondorosi, A., Ratet, P. y Palomares, A.J.** (2004). From pollen tubes to infection threads: recruitment of *Medicago* floral pectic genes for symbiosis. *The Plant Journal* **39**: 587-598.

**Romanov, V.I., Gordon, A.J., Minchin, F.R., Witty, J.F., Skot, L., James, C.L. y Tikhonovich, I.A.** (1998). Physiological and biochemical characteristics of FN1, a 'fixation impaired' mutant of pea (*Pisum sativum* L.). *Journal of Experimental Botany* **49**: 1789-1796.

**Ronson, C.W., Lyttleton, P. y Robertson, J.G.** (1981). C4-dicarboxylate transport mutants of *Rhizobium-trifolii* form ineffective nodules on *Trifolium-repens*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences* **78**: 4284-4288.



**Rosenblueth, A. y Wiener, N.** (1945). The role of models in science. *Philosophy of Science* **12**: 316-321.

**Rosendahl, L., Vance, C.P. y Pedersen, W.B.** (1990). Products of dark CO<sub>2</sub> fixation in pea root-nodules support bacteroid metabolism. *Plant Physiology* **93**: 12-19.

**Roslycky, E.B.** (1976). Response of soil microbiota to selected herbicide treatments. *Canadian Journal of Microbiology* **23**: 426-433.

**Ross, E.J.H., Kramer, S.B. y Dalton, D.A.** (1999). Effectiveness of ascorbate and ascorbate peroxidase in promoting nitrogen fixation in model systems. *Phytochemistry* **52**: 1203-1210.

**Roxas, V.P., Lodhi, S.A., Garrett, D.K., Mahan, J.R. y Allen, R.D.** (2000). Stress tolerance in transgenic tobacco seedlings that overexpress glutathione S-transferase/glutathione peroxidase. *Plant and Cell Physiology* **41**: 1229-1234.

**Rozema, J., Gude, H., Bijl, F. y Wesselman, H.** (1981). Sodium concentration in xylem sap in relation to ion exclusion, accumulation and secretion in halophytes. *Acta Botanica Neerlandica* **30**: 309-311.

**Rubio, M.C., Gonzalez, E.M., Minchin, F.R., Webb, K.J., Arrese-Igor, C., Ramos, J. y Becana, M.** (2002). Effects of water stress on antioxidant enzymes of leaves and nodules of transgenic alfalfa overexpressing superoxide dismutases. *Physiologia Plantarum* **115**: 531-540.

**Rubio, M.C., James, E.K., Clemente, M.R., Bucciarelli, B., Fedorova, M., Vance, C.P. y Becana, M.** (2004). Localization of superoxide dismutases and hydrogen peroxide in legume root nodules. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **17**: 1294-305.

**Saint, C.P., Wexler, M., Murphy, P.J., Tempe, J., Tate, N.E. y Murphy, P.J.** (1993). Characterization of genes for synthesis and catabolism of a new rhizopine induced in nodules by *Rhizobium meliloti* Rm220-3: Extension of the rhizopine concept. *Journal of Bacteriology* **175**: 5205-5215.

**Salin, M.L.** (1988). Toxic oxygen species and protective systems of chloroplast. *Physiologia Plantarum* **72**: 681-689.

**Salin, M.L. y Bridges, S.M.** (1980). Localization of superoxide dismutase in chloroplasts from *Brassica campestris*. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* **99**: 37-47.

**Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T.** (1989). Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.

**Sánchez, F., Padilla, J.E., Pérez H. y Lara, M.** (1991) Control of nodulin genes in root nodule developmental metabolism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **42**: 507-28.

**Sánchez-Fernández, R., Fricker, M., Corben, L.B., White, N.S., Sheard, N., Leaver, C.J., Van Montagu, M., Inze, D. y May, M.J.** (1997). Cell proliferation and

hair tip growth in the *Arabidopsis* root are under mechanistically different forms of redox control. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **94**: 2745-2750.

**Sandalio, L.M. y del Río, L.A.** (1987). Localization of superoxide dismutase in glyoxysomes from *Citrullus vulgaris*: functional implications in cellular metabolism. *Journal of Plant Physiology* **127**: 395-409.

**Sanders, D., Brownlee, C. y Harper, J.F.** (1999). Communicating with calcium. *Plant Cell* **11**: 691-706.

**Sandmann, G., Peleato, M.L., Fillat, M.F., Lázaro, M.C. y Gómez-Moreno, C.** (1990). Consequences of the iron-dependent formation of ferredoxin and flavodoxin on photosynthesis and nitrogen-fixation on *Anabaena* strains. *Photosynthesis Research* **26**: 119-125.

**Sandorf, I. y Holländer-Czytko, H.** (2002). Jasmonate is involved in the induction of tyrosine aminotransferase and tocopherol biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **216**: 173-179.

**Sanmartin, M., Drogoudi, P.A., Lyons, T., Pateraki, I., Barnes, J. y Kanellis, A.K.** (2003). Over-expression of ascorbate oxidase in the apoplast of transgenic tobacco results in altered ascorbate and glutathione redox states and increased sensitivity to ozone. *Planta* **216**: 918-28.

**Santangelo, J.D., Jones, D.T. y Woods, D.R.** (1991). Metronidazole activation and isolation of *Clostridium acetobutylicum* electron transport genes. *Journal of Bacteriology* **173**: 1088-1095.

**Santos, R., Herouart, D., Puppo, A. y Touati, D.** (2000). Critical protective role of bacterial superoxide dismutase in *Rhizobium-legume* symbiosis. *Molecular Microbiology* **38**: 750-759.

**Santos, R., Herouart, D., Sigaud, S., Touati, D. y Puppo, A.** (2001). Oxidative burst in alfalfa-*Sinorhizobium meliloti* symbiotic interaction. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **14**: 86-89.

**Sanyal, I., Gibson, K.J. y Flint, D.H.** (1996). *Escherichia coli* biotin synthase: an investigation into the factors required for its activity and its sulfur donor. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **326**: 48-56.

**Sattler, S.E., Gilliland, L.U., Magallanes-Lundback, M., Pollard, y DellaPenna, M.D.** (2004). Vitamin E is essential for seed longevity and for preventing lipid peroxidation during germination. *Plant Cell* **16**: 1419-1432.

**Sauvage, D., Hamelin, J. y Larher, F.** (1983). Glycine betaine and other structurally related-compounds improve the salt tolerance of *Rhizobium-meliloti*. *Plant Science Letters* **31**: 291-302.



- Savka, M.A., Dessaux, Y., Oger, P. y Rossbach, S. (2002). Engineering bacterial competitiveness and persistence in the phytosphere. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **15**: 866-874.
- Sawers, G. y Watson, G. (1998). A glycol radical solution: oxygen-dependent interconversion of pyruvate formate-lyase. *Molecular Microbiology* **29**: 945-954.
- Scandalios, J.G. (1993). Oxygen stress and superoxide dismutase. *Plant Physiology* **101**: 7-12.
- Scandalios, J.G., Guan, L. y Polidoros, A.N. (1997). Catalases in plants: Gene structure, properties, regulation, and expression. *Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses* Eds. Scandalios, J.G. Cold Spring Harbor, New York. pp. 343-406.
- Scheidle, H., Gross, A. y Niehaus, K. (2005). The Lipid A substructure of the Sinorhizobium meliloti lipopolysaccharides is sufficient to suppress the oxidative burst in host plants. *New Phytologist* **165**: 559-565.
- Schenck, R.U., y Hildebrant, A.C. (1972). Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Canadian Journal Botánica* **50**: 199-204.
- Scheres, B., van de Wiel, C., Zalensky, A., Horvath, B., Spaink, H., van Eck, H., Zwartkruis, F., Wolters, A.M., Gloudemans, T., van Kammen, A. y Bisseling, T. (1990). The ENOD12 gene product is involved in the infection process during the pea-Rhizobium interaction. *Cell* **60**: 281-94.
- Schöffl, F., Prändl, R. y Reindl, A. (1998). Regulation of the heat-shock response. *Plant Physiology* **117**: 1135-1141.
- Schrautemeier, B. y Bohme, H. (1992). Coding sequence of a heterocyst ferredoxin gene (fdxh) isolated from the nitrogen-fixing cyanobacterium *Calothrix* sp PCC-7601. *Plant Molecular Biology* **18**: 1005-1006.
- Scott, D.B., Wilson, R., Shaw, G.J., Petit, A., y Tempe, J. (1987). Biosynthesis and degradation of nodule-specific *Rhizobium loti* compounds in *Lotus* nodules. *Journal of Bacteriology* **169**: 278-282.
- Scrutton, N.S., Berri, A., y Perham, R.N. (1987). Purification and characterization of a glutathione reductase encoded by a cloned and overexpressed gene in *Escherichia coli*. *Biochemical Journal* **245**: 875-880.
- Searcy, K.B. y Searcy, D.G. (1981). Superoxide dismutase from the *Archaeobacterium Thermoplasma acidophilum*. *Biochimica et Biophysica Acta* **670**: 39-46.
- Seghers, D., Verthe, K., Reheul, D., Bulcke, R., Siciliano, S.D., Verstraete, W. y Top, E.M. (2003). Effect of long-term herbicide applications on the bacterial community structure and function in an agricultural soil. *FEMS Microbiology Ecology* **46**: 139-146.

Seki, M., Ishida, J., Narusaka, M., Fujita, M., Nanjo, T., Umezawa, T., Kamiya, A., Nakajima, M., Enju, A., Sakurai, T., Satou, M., Akiyama, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., Carninci, P., Kawai, J., Hayashizaki, Y. y Shinozaki, K. (2002). Monitoring the expression pattern of around 7,000 Arabidopsis genes under ABA treatments using a full-length cDNA microarray. *Functional and integrative genomics* 2: 282-291.

Serraj, R. (2003). Effects of drought stress on legume symbiotic nitrogen fixation: physiological mechanisms. *Indian Journal of Experimental Biology* 41: 1136-1141.

Serraj, R. y Drevon, J.J. (1998). Effects of salinity and nitrogen source on growth and nitrogen fixation in alfalfa. *Journal of Plant Nutrition* 21: 1805-1818.

Serraj, R. y Sinclair, T.R. (1996). Inhibition of nitrogenase activity and nodule oxygen permeability by water deficit. *Journal of Experimental Botany* 47: 1067-1073.

Serraj, R., Fleurat-Lessard, P., Jaillard, B. y Drevon, J.J. (1995). Structural-changes in the inner-cortex cells of soybean root-nodules are induced by short-term exposure to high-salt or oxygen concentrations. *Plant Cell and Environment* 18: 455-462.

Serraj, R., Roy, G. y Drevon, J.J. (1994). Salt stress induces a decrease in the oxygen-uptake of soybean nodules and in their permeability to oxygen diffusion. *Physiologia Plantarum* 91: 161-168.

Serraj, R., Vázquez-Díaz, H., Hernández, G. y Drevon, J.J. (2001). Genotypic difference in the short-term response of nitrogenase activity (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> reduction) to salinity and oxygen in the common bean. *Agronomie* 21: 645-651.

Serrano, R., Mulet, J.M., Rios, G., Marquez, J.A., Larrinoa, I.F., Leube, M.P., Mendizábal, I., Pascual-Ahuir, A., Proft, M., Ros, R. y Montesinos, C. (1999). A glimpse of the mechanisms of ion homeostasis during salt stress. *Journal of Experimental Botany* 50: 1023-1036.

Shah, V.K., Stacey, G. y Brill, W.J. (1983). Electron-transport to nitrogenase - purification and characterization of pyruvate, flavodoxin oxidoreductase, the nifJ-gene product. *Journal of Biological Chemistry* 258: 2064-2068.

Shah, V.K., Stacey, G. y Brill, W.J. (1983). Electron transport to nitrogenase. Purification and characterization of pyruvate:flavodoxin oxidoreductase. The nifJ gene product. *The Journal of Biological Chemistry* 258: 12064-12068.

Shaw, S.L. y Long, S.R. (2003). Nod factor inhibition of reactive oxygen efflux in host legume. *Plant Physiology* 132: 2196-2204.

Sheokand, S. y Swaraj, K. (1996). Natural and dark-induced nodule senescence in chickpea: Nodule functioning and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> scavenging enzymes. *Biologia Plantarum* 38: 545-554.

Sheokand, S., Babber, S. y Swaraj, K. (1998). Nodule structure and functioning in *Cicer arietinum* as affected by nitrate. *Biologia Plantarum* 41: 435-443.



**Sheokand, S., Dahiya, P., Vincent, J.L. y Brewin, N.J.** (2005). Modified expression of cysteine protease affects seed germination, vegetative growth and nodule development in transgenic lines of *Medicago truncatula*. *Plant Science* **169**: 966-975.

**Sheokand, S., Dhandi, S. y Swaraj, K.** (1995). Studies on nodule functioning and hydrogen-peroxide scavenging enzymes under salt stress in chickpea nodules. *Plant Physiology and Biochemistry* **33**: 561-566.

**Sherrel, C.G.** (1983). Sodium and potassium effects on cation concentration and yield of Lucerne and phalaris grown separately and together. *Journal of Plant Nutrition* **6**: 801-816.

**Shi, W.M., Takamatsu, A., Ueda, A., Suzuki, K., Shono, M., Egawa, Y. y Takabe, T.** (2001). Overexpression of peroxisomal ascorbate peroxidase gene confers the thermotolerance of *Arabidopsis thaliana* at both the vegetative stage and reproductive stage. *Plant and Cell Physiology* **43**: S114-S114.

**Shigeoka, S., Ishikawa, T., Tamoi, M., Miyagawa, Y., Takeda, T., Yabuta, Y. y Yoshimura, K.** (2002). Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *Journal of Experimental Botany* **53**: 1305-1319.

**Shinozaki, K. y Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2000). Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signalling pathways. *Current Opinion in Plant Biology* **3**: 327-334.

**Sidak, Z.** (1967). Rectangular confidence regions for the means of the multivariate normal distributions. *Journal of the American Statistical Association* **62**: 626-633.

**Sigaud, S., Becquet, V., Frendo, P., Puppo, A. y Herouart, D.** (1999). Differential regulation of two divergent *Sinorhizobium meliloti* genes for HPII-like catalases during free-living growth and protective role of both catalases during symbiosis. *Journal of Bacteriology* **181**: 2634-2639.

**Signora, L., de Smet, I., Foyer, C.H. y Zhang, H.** (2001). ABA plays a central role in mediating the regulatory effects of nitrate on root branching in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **28**: 655-662.

**Simondsen, R.P. y Tollin, G.** (1980). Structure-function relations in flavodoxins. *Molecular and Cellular Biochemistry* **33**: 13-24.

**Sinclair, T.R. y Serraj, R.** (1995). Legume nitrogen fixation and drought. *Nature* **378**: 344.

**Singh, B., Singh, B.K., Kumar, J., Yadav, S.S. y Usha, K.** (2005). Effects of salt stress on growth, nodulation, and nitrogen and carbon fixation of ten genetically diverse lines of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Australian Journal of Agricultural Research* **56**: 491-495.

**Singleton, P.W. y Bohlool, B.B.** (1983). Effect of salinity on the functional components of the soybean-*Rhizobium japonicum* symbiosis. *Crop Science* **23**: 815-818.

**Singleton, P.W. y Bohlool, B.B.** (1984). Effect of salinity on nodule formation by soybean. *Plant Physiology* **74**: 72-76.

**Singleton, P.W., Elswaify, S.A. y Bohlool, B.B.** (1982). Effect of salinity on *Rhizobium* growth and survival. *Applied and Environmental Microbiology* **44**: 884-890.

**Smart, C.C., Fleming, A.J., Chaloupkova, K. y Hanke, D.E.** (1995). The physiological role of abscisic acid in eliciting turion morphogenesis. *Plant Physiology* **108**: 623-632.

**Smirnoff, N.** (1993). The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytologist* **125**: 27-58.

**Smit, G., Swart, S., Lugtenberg, B.J. y Kijne, J.W.** (1992). Molecular mechanisms of attachment of *Rhizobium* bacteria to plant roots. *Molecular Microbiology* **6**: 2897-2903.

**Smith, D., Dobrenz, A.K. y Schonhorst, M.H.** (1981). Response of alfalfa seedling plants to high-levels of chloride-salts. *Journal of Plant Nutrition* **4**: 143-174.

**Smith, M.W. y Doolittle, R.F.** (1992). A comparison of evolutionary rates of the two major kinds of superoxide dismutase. *Journal of Molecular Evolution* **34**: 175-184.

**Solomon, K., Baker, D., Richards, R., Dixon, K., Klaine, S., Point, T., Kendall, R., Weisskopf, C., Giddings, J., Giesy, J., Hall, L.J. y Williams, W.** (1996). Ecological risk assessment of atrazine in North American surface waters. *Environmental Toxicology and Chemistry* **15**: 31-76.

**Soussi, M., Lluch, C. y Ocaña, A.** (1999). Comparative study of nitrogen fixation and carbon metabolism in two chick-pea (*Cicer arietinum* L.) cultivars under salt stress. *Journal of Experimental Botany* **50**: 1701-1708.

**Soussi, M., Ocaña, A. y Lluch, C.** (1998). Effects of salt stress on growth, photosynthesis and nitrogen fixation in chick-pea (*Cicer arietinum* L.). *Journal of Experimental Botany* **49**: 1329-1337.

**Soussi, M., Ocaña, A. y Lluch, C.** (1998). Effects of salt stress on growth, photosynthesis and nitrogen fixation in chick-pea (*Cicer arietinum* L.). *Journal of Experimental Botany* **49**: 1329-1337.

**Soussi, M., Santamaría, M., Ocaña, A. y Lluch, C.** (2001). Effects of salinity on protein and lipopolysaccharide pattern in a salt-tolerant strain of *Mesorhizobium ciceri*. *Journal of Applied Microbiology* **90**: 476-81.

**Spaink, H.P., Wijffelman, C.A., Pees, E., Okker, R.J. y Lugtenberg, B.J.** (1987). *Rhizobium* nodulation gene *nodD* as a determinant of host specificity. *Nature* **328**: 337-340.



- Sprent, J.I. y Zahran, H.H.** (1988). Infection, development and functioning of nodules under drought and salinity. *Nitrogen Fixation by legumes in Mediterranean agriculture* Eds. Beck, D.P. y Materon, L.A. Dordrecht, The Netherlands.
- Sprout, S.L., Nelson, L.M. y Germida, J.J.** (1992). Influence of metribuzin on the *Rhizobium leguminosarum*--lentil (*Lens culinaris*) symbiosis. *Canadian journal of microbiology* **38**: 343-349.
- Sriprang, R., Hayashi, M., Yamashita, M., Ono, H., Saeki, K. y Murooka, Y.** (2002). A novel bioremediation system for heavy metals using the symbiosis between leguminous plant and genetically engineered rhizobia. *Journal of Biotechnology* **99**: 279-93.
- Stachelin, C., Charon, C., Boller, T., Crespi, M. y Kondorosi, A.** (2001). *Medicago truncatula* plants overexpressing the early nodulin gene *enod40* exhibit accelerated mycorrhizal colonization and enhanced formation of arbuscules. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **98**: 15366-15371.
- Stachelin, C., Granado, J., Muller, J., Wiemken, A., Mellor, R.B., Felix, G., Regenass, M., Broughton, W.J. y Boller, T.** (1994). Perception of *Rhizobium* nodulation factors by tomato cells and inactivation by root chitinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **91**: 2196-2200.
- Staskawicz, B., Dahlbeck, D., Keen, N. y Napoli, C.** (1987). Molecular characterization of cloned avirulence genes from race 0 and race 1 of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. *Journal of Bacteriology* **169**: 5789-5794.
- Steinman, H.M.** (1982). Copper-zinc superoxide dismutase from *Caulobacter crescentus* CB15. A novel bacteriocuprein form of the enzyme. *Journal of Biological Chemistry* **257**: 10283-10293.
- Steinman, H.M.** (1985). Bacteriocuprein superoxide dismutases in pseudomonads. *Journal of Bacteriology* **162**: 1255-1260.
- Stockinger, E.J., Gilmour, S.J. y Thomashow, M.F.** (1997). *Arabidopsis thaliana* CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **94**: 1035-1040.
- Streeter, J.G.** (1987). Carbohydrate, organic acid, and amino acid composition of bacteroids and cytosol from soybean nodules. *Plant Physiology* **85**: 768-773.
- Streeter, J.G.** (1994). Failure of inoculant rhizobia to overcome the dominance of indigenous strains for nodule formation. *Canadian Journal of Microbiology* **40**: 513-522.
- Streller, S. y Wingsle, G.** (1994). *Pinus sylvestris* L. needles contain extracellular CuZn superoxide dismutase. *Planta* **192**: 195-201.



- Streller, S., Kromer, S. y Wingsle, G.** (1994). Isolation and purification of mitochondrial Mn-superoxide dismutase from the gymnosperm *Pinus sylvestris* L. *Plant Cell Physiology* **35**: 859-867.
- Strong, L.C., McTavish, H., Sadowsky, M.J. y Wackett, L.P.** (2000). Field-scale remediation of atrazine-contaminated soil using recombinant *Escherichia coli* expressing atrazine chlorohydrolase. *Environmental Microbiology* **2**: 91-98.
- Struthers, J.K., Jayachandran, K. y Moorman, T.B.** (1998). Biodegradation of atrazine by *Agrobacterium radiobacter* J14a and use of this strain in bioremediation of contaminated soil. *Applied and Environmental Microbiology* **64**: 3368-3375.
- Suganuma, N., Okada, Y. y Kanayama, Y.** (1997). Isolation of a cDNA for nodule-enhanced phosphoenolpyruvate carboxylase from pea and its expression in effective and plant-determined ineffective pea nodules. *Journal of Experimental Botany* **48**: 1165-1173.
- Sunkar, R., Bartels, D. y Kirch, H.H.** (2003). Overexpression of a stress-inducible aldehyde dehydrogenase gene from *Arabidopsis thaliana* in transgenic plants improves stress tolerance. *Plant Journal* **35**: 452-464.
- Sutton, W.D.** (1983). Nodule development and senescence. Ed Broughton, W.J. *Nitrogen Fixation* **3**: 144-213. Claredon Press, Oxford UK.
- Suzuki, M., Miyamoto, R., Hattori, T., Nakamura, K. y Asahi, T.** (1995). Differential regulation of the expresión in transgenic tobacco of the gene for  $\beta$ -glucuronidase under the control of the 5'-upstream regions of two catalase genes from castor bean. *Plant Cell Physiology* **36**: 273-279.
- Swaraj, K. y Bishnoi, N.R.** (1996). Physiological and biochemical basis of nodule senescence in legumes: a review. *Plant Physiology and Biochemistry* **23**: 105-116.
- Swaraj, K. y Bishnoi, N.R.** (1999). Effect of salt stress on nodulation and nitrogen fixation in legumes. *Indian Journal of Experimental Biology* **37**: 843-848.
- Swaraj, K., Dhandi, S. y Sheokand, S.** (1995). Relationship between defense mechanism against activated oxygen species and nodule functioning with progress in plant and nodule development in *Cajanus cajan* L Mill sp. *Plant Science* **112**: 65-74.
- Swaraj, K., Laura, J.S. y Bishnoi, N.R.** (1993). Nitrate induced nodule senescence and changes in activities of enzymes scavenging  $H_2O_2$  in clusterbean (*Cyamopsis tetragonaloba* Taub.). *Journal of Plant Physiology* **141**: 202-205.
- Swaraj, K., Laura, J.S. y Bishnoi, N.R.** (1994). Dark treatment effects on nitrogen fixation and enzymes associated with scavenging hydrogen peroxide in clusterbean nodules. *Plant Physiology and Biochemistry* **32**: 115-119.
- Sy, A., Giraud, E., Jourand, P., Garcia, N., Willems, A., de Lajudie, P., Prin, Y., Neyra, M., Gillis, M., Boivin-Masson, C. y Dreyfus, B.** (2001). Methylothrophic



Methylobacterium bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. *Journal of Bacteriology* **183**: 214-220.

**Takahama, U. y Oniki, T.** (1994). The association of ascorbate and ascorbate oxidase in the apoplast with IAA-enhanced elongation of epycotyls from *Vigna angularis*. *Plant and Cell Physiology* **35**: 257-266.

**Takahama, U. y Oniki, T.** (1997). A peroxide/phenolics/ascorbate system can scavenge hydrogen peroxide in plant cells. *Physiologia Plantarum* **101**: 845-852.

**Takahashi, M.A. y Asada, K.** (1983). Superoxide anion permeability of phospholipid membranes and chloroplast thylakoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **226**: 558-566.

**Takeda, T., Nakana, Y. y Shigeoka, S.** (1993). Effects of selenite, CO<sub>2</sub> and illumination on the induction of selenium-dependent glutathione-peroxidase in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Science* **94**: 81-88.

**Tanaka, M., Haniu, M., Matsueda, G., Yasunobu, K.T., Mayhew, S. y Massey, V.** (1971). Amino- and carboxyl-terminal amino acid sequences of the *Peptostreptococcus elsdenii* and *Clostridium pasteurianum* flavodoxins. *Biochemistry* **10**: 3041-3046.

**Tanaka, M., Haniu, M., Yasunobu, K.T. y Mayhew, S.G.** (1974). The amino acid sequence of the *Clostridium MP* flavodoxin. *Journal of Biological Biochemistry* **249**: 4393-4396.

**Tang, C.X., Robson, A.D. y Dilworth, M.J.** (1990a). The role of iron in nodulation and nitrogen-fixation in *Lupinus angustifolius* L. *New phytologist* **114**: 173-182.

**Tang, C.X., Robson, A.D. y Dilworth, M.J.** (1990b). A split-root experiment shows that iron is required for nodule initiation in *Lupinus angustifolius* L. *New phytologist* **115**: 61-67.

**Tang, X. y Webb, M.A.** (1994). Soybean root nodule cDNA encoding glutathione reductase. *Plant Physiology* **104**: 1081-1082.

**Tansengco, M.L., Hayashi, M., Kawaguchi, M., Imaizumi-Anraku, H. y Murooka, Y.** (2003). Crinkle, a novel symbiotic mutant that affects the infection thread growth and alters the root hair, trichome, and seed development in *Lotus japonicus*. *Plant Physiology* **131**: 1054-1063.

**Taté, R., Patriarca, E.J., Riccio, A., Defez, R. e Iaccarino, M.** (1994). Development of *Phaseolus vulgaris* root nodules. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **7**: 582-589.

**Taté, R., Riccio, A., Merrick, M. y Patriarca, E.J.** (1998). The *Rhizobium etli* *amtB* gene coding for an NH<sub>4</sub><sup>+</sup> transporter is down-regulated early during bacteroid differentiation. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **12**: 512-525.

- Tejera, N.A., Campos, R., Sanjuán, J. y Lluch, C.** (2004). Nitrogenase and antioxidant enzyme activities in *Phaseolus vulgaris* nodules formed by *Rhizobium tropici* isogenic strains with varying tolerance to salt stress. *Journal of Plant Physiology* **161**: 329-338.
- Terry, R.E., Soerensen, K.U., Jolley, V. y Brown, J.C.** (1991). The role of active *Bradyrhizobium-japonicum* in iron stress response of soybeans. *Plant and Soil* **130**: 225-230.
- Theil, E.C.** (1987). Ferritin: structure, gene regulation, and cellular function in animals, plants, and microorganisms. *Annual Review of Biochemistry* **56**: 289-315.
- Thomashow, M.F.** (1998). Role of cold-responsive genes in plant freezing tolerance. *Plant Physiology* **118**: 1-8.
- Thomashow, M.F.** (1999). Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annual Review of Plant Biology* **50**: 571-599.
- Thummler, F. y Verma, D.P.** (1987). Nodulin-100 of soybean is the subunit of sucrose synthase regulated by the availability of free heme in nodules. *Journal of Biological Chemistry* **262**: 14730-14736.
- Thummler, F. Y Verma, D.P.S.** (1987). Nodulin-100 of soybean is the subunit of sucrose synthase regulated by the availability of free heme in nodules. *Journal of Biological Chemistry* **262**: 14730-14736.
- Timmers, A.C.J., Auriac, M.C. y Truchet, G.** (1999). Refined analysis of early symbiotic steps of the *Rhizobium-Medicago* interaction in relationship with microtubular cytoskeleton rearrangements. *Development* **125**: 339-349.
- Timmers, A.C.J., Soupene, E., Auriac, M.C., de Billy, F., Boistard, P. y Truchet, G.** (2000). Saprophytic intracellular rhizobia in alfalfa nodules. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **13**: 1204-1213.
- Topp, E.** (2001). A comparison of three atrazine-degrading bacteria for soil bioremediation. *Biology and Fertility of Soils* **33**: 529-534.
- Topp, E., Martin-Laurent, F., Hartmann, A., Soulas, G.** (2004). Bioremediation of atrazine-contaminated soil. *Pesticide Decontamination and Detoxification ACS Symposium Series* **863**: 141-154.
- Toro N.** (1996). Nodulation competitiveness in the *Rhizobium* legume symbiosis. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* **12**: 157-162.
- Trepp, G.B., Temple, S.J., Bucciarelli, B., Shi, L.F. y Vance, C.P.** (1999). Expression map for genes involved in nitrogen and carbon metabolism in alfalfa root nodules. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **12**: 526-535.
- Trieu, A.T., Burleigh, S.H., Kardailsky, I.V., Maldonado-Mendoza, I.E., Versaw, W.K., Blaylock, L.A., Shin, H., Chiou, T.J., Katagi, H., Dewbre, G.R, Weigel, D. y**



**Harrison, M.J.** (2000). Transformation of *Medicago truncatula* via infiltration of seedlings or flowering plants with *Agrobacterium*. *Plant Journal* **22**: 531-541.

**Trihn, H.T., Ratet, P., Kondorosi, E., Durand, P., Kamaté, K., Bauer, P. y Kondorosi A.** (1998). Rapid and efficient transformation of diploid *Medicago truncatula* and *Medicago sativa* ssp. *Falcata* lines improved in somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports* **17**: 345-355.

**Triplett, E.W. y Sadowsky, M.J.** (1992). Genetics of competition for nodulation of legumes. *Annual Review of Microbiology* **46**: 399-428.

**Triplett, E.W. y Sadowsky, M.J.** (1992). Genetics of competition for nodulation of legumes. *Annual Review of Microbiology* **46**: 399-428.

**Trujillo, M.E., Willems, A., Abril, A., Planchuelo, M., Rivas, R., Ludena, D., Mateos, P.F., Martinez-Molina, E. y Velásquez, E.** (2005). Nodulation of *Lupinus albus* by strains of *Ochrobactrum lupini* sp. nov. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 1318-27.

**Tu, C.M.** (1992). Effect of some herbicides on activities of microorganisms and enzymes in soil. *Journal of Environmental Science and Health Part B-Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes* **27**: 695-709.

**Tu, J.C.** (1975). Structural similarity of the membrane envelopes of rhizobial bacteroids and the host plasma membrane as revealed by freeze-fracturing. *Journal of Bacteriology* **122**: 691-694.

**Tu, J.C.** (1981). Effect of salinity on rhizobium-root-hair interaction, nodulation and growth of soybean. *Canadian Journal of Plant Science* **61**: 231-239.

**Turgeon, B.G. y Bauer, W.D.** (1982). Early events in the infection of soybean by *Rhizobium japonicum*. Time course and cytology of the infection process. *Canadian Journal of Botany* **60**: 152-161.

**Turrens, J.F., Freeman, B.A. y Crapo, J.D.** (1982). Hyperoxia increases H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release by lung mitochondria and microsomes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **217**: 411-421.

**Tyerman, S.D., Bohnert, H.J., Maurel, C., Steudle, E. y Smith, J.A.C.** (1999). Plant aquaporins: their molecular biology, biophysics and significance for plant water relations. *Journal of Experimental Botany* **50**: 1055-1071.

**Tyerman, S.D., Whitehead, L.F. y Day, D.A.** (1995). A channel-like transporter for NH<sub>4</sub><sup>+</sup> on the symbiotic interface of N<sub>2</sub> fixing plants. *Nature* **378**: 629-632.

**Udvardi, M.K. y Day, D.A.** (1997). Metabolite transport across symbiotic membranes of legume nodules. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **48**: 493-523.

**Udvardi, M.K.** (2001). Legume models strut their stuff. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **14**: 6-9.

**Udvardi, M.K., Lister, D.L., y Day, D.A.** (1991). ATPase activity and anion transport across the peribacteroid membrane of isolated soybean symbiosomes. *Archives of Microbiology* **156**: 362-366.

**Udvardi, M.K., Ou Yang, L.J., Young, S. y Day, D.A.** (1990). Sugar and amino acid transport across symbiotic membranes from soybean nodules. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **3**: 334-340.

**Udvardi, M.K., Salom, C.L. y Day, D.A.** (1988). Transport of L-glutamate across the bacteroid membrane but not the peribacteroid membrane from soybean root nodules. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **1**: 250-254.

**Urao, T., Yakubov, B., Satoh, R., Yamaguchi-Shinozaki, K., Seki, M., Hirayama, T. y Shinozaki, K.** (1999). A transmembrane hybrid-type histidine kinase in *Arabidopsis* functions as an osmosensor. *Plant Cell* **11**: 1743-1754.

**Van Berkum, P. y Eardly, B.D.** (2002). The Aquatic Budding Bacterium *Blastobacter denitrificans* Is a Nitrogen-Fixing Symbiont of *Aeschynomene indica*. *Applied and Environmental Microbiology* **68**: 1132-1136.

**Van Camp, W., Willekens, H., Bowler, C., Van Montagu, M., Inze, D., Reupold-Popp, P., Sandermann, H. Jr. y Langebartels, C.** (1994). Elevated levels of superoxide dismutase protect transgenic plant against ozone damage. *Bio/technology* **12**: 165-168.

**Van Dillewijn, P., Soto, M.J., Villadas, P.J. y Toro, N.** (2001). Construction and environmental release of a *Sinorhizobium meliloti* strain genetically modified to be more competitive for alfalfa nodulation. *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 3860-3865.

**Van Heerden PD, Kruger GH.** (2004). Dark chilling inhibition of photosynthesis and symbiotic nitrogen fixation in soybean during pod filling. *Journal of Plant Physiology* **161**: 599-609.

**Van Spronsen, P.C., Bakhuizen, R., van Brussel, A.A. y Kijne, J.W.** (1994). Cell wall degradation during infection thread formation by the root nodule bacterium *Rhizobium leguminosarum* is a two-step process. *European Journal of Cell Biology* **64**: 88-94.

**Vanacker, H., Carver, T.L. y Foyer, C.H.** (2000). Early  $H_2O_2$  accumulation in mesophyll cells leads to induction of glutathione during the hypersensitive response in the barley-powdery mildew interaction. *Plant Physiology* **123**: 1289-1300.

**Vance, C.P.** (2000). Amide biosynthesis in root nodules of temperate legumes. *Prokaryotic nitrogen fixation*. E. Triplett, Ed., Wymondham: Horizon Scientific Press. pp. 589-607.



- Vance, C.P. y Heichel, G.H.** (1991). Carbon in N<sub>2</sub> fixation - limitation or exquisite adaptation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **42**: 373-392.
- Vance, C.P., Boylan, K.L.M., Maxwell, C.A., Heichel, G.H. y Hardman, L.L.** (1995). Transport and partitioning of co<sub>2</sub> fixed by root-nodules of ureide and amide producing legumes. *Plant Physiology* **78**: 774-778.
- Vance, C.P., Heichel, G.H., Barnes, O.K., Bryan, J.W. y Johnson, L.E.** (1979). Nitrogen fixation, nodule development, and vegetative regrowth of alfalfa (*Medicago sativa* L.) following harvest. *Plant Physiology* **64**: 1-8.
- Vance, C.P., Johnson, L.E.B., Halvorsen, A.M., Heichel, G.H. y Barnes, D.K.** (1980). Histological and ultrastructural observations of *Medicago-sativa* root nodule senescence after foliage removal. *Canadian Journal of Botany* **58**: 295-309.
- Vandamme, P., Goris, J., Chen, W.M., De Vos, P. y Willems, A.** (2002). *Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia phymatum* sp. nov., nodulate the roots of tropical legumes. *Systematic and applied microbiology* **25**: 507-512.
- Vandercammen, A., Francois, J. y Hers, H.G.** (1989). Characterization of trehalose-6-phosphate synthase and trehalose-6-phosphate phosphatase of *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal of Biochemistry* **182**: 613-620.
- Vanyushin, B.F, Bakeeva, L.E., Zamyatnina, V.A. y Aleksandrushkina, N.I.** (2004). Apoptosis in plants: specific features of plant apoptotic cells and effect of various factors and agents. *International Review of Cytology* **233**: 135-79.
- Vasse, J., de Billy, F., Camut, S. y Truchet, G.** (1990). Correlation between ultrastructural differentiation of bacteroids and nitrogen fixation in alfalfa nodules. *Journal of Bacteriology* **172**: 4295-4306.
- Vasse, J., Debilly, F. y Truchet, G.** (1993). Abortion of infection during the *rhizobium meliloti*-alfalfa symbiotic interaction is accompanied by a hypersensitive reaction. *Plant Journal* **4**: 555-566.
- Verdoy, D., Lucas, M.M., Manrique, E., Covarrubias, A.A., De Felipe, M.R. y Pueyo, J.J.** (2004). Differential organ-specific response to salt stress and water deficit in nodulated bean (*Phaseolus vulgaris*). *Plant, Cell & Environment* **27**: 757-767.
- Verdoy, M.D.** (2004). Estudio de la respuesta de leguminosas a los estreses hídrico y salino y obtención de plantas tolerantes por acumulación de osmolitos. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Madrid.
- Verma, D.P. y Hong, Z.** (1996). Biogenesis of the peribacteroid membrane in root nodules. *Trends in Microbiology* **4**: 364-8.
- Vessey J.K., Raper, C.D. y Henry, L.T.** (1999). Cyclic variations in nitrogen uptake rate in soybean plants - uptake during reproductive growth. *Journal of Experimental Botany* **41**: 1579-1584.

- Vianello, A. y Macri, F.** (1991). Generation of superoxide anion and hydrogen peroxide at surface of plant cells. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* **23**: 409-423.
- Vierling, E.** (1991). The roles of heat-shock proteins in plants. *Annual Review of Plant Biology* **42**: 579-620.
- Vikman, P.A. y Vessey, J.K.** (1992). The decline in n-2 fixation rate in common bean with the onset of pod-filling - fact or artifact. *Plant and Soil* **147**: 95-105.
- Vile, G.F. y Tyrrell, R.M.** (1993). Oxidative stress resulting from ultraviolet A irradiation of human skin fibroblasts leads to a heme oxygenase-dependent increase in ferritin. *Journal of Biological Chemistry* **268**: 14678-14681.
- Vinardell, J.M., Fedorova, E., Cebolla, A., Kevei, Z., Horvath, G., Kelemen, Z., Tarayre, S., Roudier, F., Mergaert, P., Kondorosi, A. y Kondorosi, E.** (2003). Endoreduplication mediated by the anaphase-promoting complex activator CCS52A is required for symbiotic cell differentiation in *Medicago truncatula* nodules. *Plant Cell* **15**: 2093-2105.
- Vincent, J.M.** (1970). A manual for the practical study of root nodule bacteria. IBP Handbook No. 15. Oxford, Blackwell Scientific Publications, Oxford, England.
- Walden, R., Cordeiro, A. y Tiburcio, A.F.** (1997). Polyamines: small molecules triggering pathways in plant growth and development. *Plant Physiol* **113**: 1009-1013.
- Walsh, K.B.** (1995). Physiology of the legume nodule and its response to stress. *Soil Biology & Biochemistry* **27**: 637-655.
- Walshaw, D.L. y Poole, P.S.** (1996). The general L-amino acid permease of *Rhizobium leguminosarum* is an ABC uptake system that also influences efflux of solutes. *Molecular Microbiology* **21**: 1239-1252.
- Wang, F.Z., Wang, Q.B., Kwon, S.Y., Kwak, S.S. y Su, W.A.** (2005). Enhanced drought tolerance of transgenic rice plants expressing a pea manganese superoxide dismutase. *Journal of Plant Physiology* **162**: 465-472.
- Wang, J., Zhang, H. y Allen, R.D.** (1999). Overexpression of an Arabidopsis peroxisomal ascorbate peroxidase gene in tobacco increases protection against oxidative stress. *Plant and Cell Physiology* **40**: 725-732.
- Wang, L., Samac, D.A., Shapir, N., Wackett, L.P., Vance, C.P., Olszewski, N.E. y Sadowsky, M.J.** (2005). Biodegradation of atrazine in transgenic plants expressing a modified bacterial atrazine chlorohydrolase (atxA) gene. *Plant Biotechnology Journal* **3**: 475-486.
- Wang, T. y Martínez-Romero, E.** (2000). Phylogeny of root and stem-nodule bacteria associated with legumes. *Prokaryotic Nitrogen Fixation: A Model System for Analysis of a Biological Process*. Ed. Triplett, E. W. Horizon Scientific Press, Wymondham, U.K., pp. 177-186.



- Wang, W., Vinocur, B. y Altman, A. (2003). Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* **218**: 1-14.
- Wang, X., Wang, C., Sang, Y., Zheng, L. y Qin, C. (2000). Determining functions of multiple phospholipase Ds in stress response of *Arabidopsis*. *Biochemical Society Transactions* **28**: 813-816.
- Wang, Y.H., Ying, Y., Chen, J. y Wang, X.C. (2004). Transgenic *Arabidopsis* overexpressing Mn-SOD enhanced salt-tolerance. *Plant Science* **167**: 671-677.
- Watson, R.J. y Rastogi, V.K. (1993). Cloning and nucleotide sequencing of *Rhizobium meliloti* aminotransferase genes: an aspartate aminotransferase required for symbiotic nitrogen fixation is atypical. *Journal of Bacteriology* **175**: 1919-1928.
- Watson, R.J., Chan, Y.K., Wheatcroft, R., Yang, A.F. y Han, S.H. (1988). *Rhizobium-meliloti* genes required for c-4-dicarboxylate transport and symbiotic nitrogen-fixation are located on a megaplasmid. *Journal of Bacteriology* **170**: 927-934.
- Wei, J.Z. y Theil, E.C. (2000). Identification and characterization of the iron regulatory element in the ferritin gene of a plant (soybean). *Journal of Biological Chemistry* **275**: 17488-17493.
- Weisbach, C., Walther, P., Hartwig, U.A. y Nosberger, J. (1999). Electron microscopic investigation of water occlusions in intercellular spaces in the inner cortex of lucerne nodules. *Journal of Structural Biology* **126**: 59-71.
- Weiss, B. (1998). Regulation of endonuclease IV as part of an oxidative stress response in *Escherichia coli*. DNA damage and repair (1). Eds. Nickoloff, J.A. y Hoekstra, M.F. Humana Press. Totowa, USA.
- Wells, W.W., Xu, D.P., Yang, Y. y Rocque, P.A. (1990). Mammalian thioltransferase (glutaredoxin) and protein disulfide isomerase have dehydroascorbate reductase activity. *Journal of Biological Chemistry* **265**: 15361-15364.
- Werner, D., Morschel, E., Stripf, R. y Winchenbach, B. (1980). Development of nodules of *Glycine max* infected with an infective strain of *Rhizobium japonicum*. *Planta* **147**: 320-329.
- Willekens, H., Chamnongpol, S., Davey, M., Schraudner, M., Langebartels, C. y Van Montagu, M. (1997). Catalase is a sink for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and is indispensable for stress defence in C3 plants. *EMBO Journal* **16**: 4806-4816.
- Willekens, H., Inzé, D., Van Montagu, M. y Van Camp, W. (1995). Catalases in plants. *Molecular Breeding* **1**: 207-228.
- Willekens, H., Villarroel, R., Van Montagu, M., Inzé, D. y Van Camp, W. (1994). Molecular identification of catalanes from *Nicotiana plumbaginifolia* (L.). *FEBS Letters* **352**: 79-83.

**Wilson, D.O. and McDonald, M.B. Jr.** (1986). The lipid peroxidation model of seed aging. *Seed Science and Technology* **14**: 269-300.

**Wilson, J.R.** (1970). Response to salinity in glycine .VI. Some effects of a range of short term salt stresses on growth, nodulation, and nitrogen fixation of *Glycine-wightii* (Formerly *javanica*). *Australian Journal of Agricultural Research* **21**: 571-582.

**Wilson, J.R.** (1985). Comparative response to salinity of the growth and nodulation of *Macroptilium-atropurpureum* cv Siratro and *Neonotonia-wightii* cv Cooper seedlings. *Australian Journal of Agricultural Research* **36**: 589-599.

**Wingsle, G.** (1989). Purification and characterization of glutathione-reductase from scots pine needles. *Physiologia Plantarum* **76**: 24-30.

**Winter, H., Huber, J.L. y Huber, S.C.** (1997). Membrane association of sucrose synthase: changes during the graviresponse and possible control by protein phosphorylation. *FEBS Letters* **420**: 151-155.

**Wisniewski, J.P., Rathbun, E.A., Knox, J.P. y Brewin, N.J.** (2000). Involvement of diamine oxidase and peroxidase in insolubilization of the extracellular matrix: Implications for pea nodule initiation by *Rhizobium leguminosarum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **13**: 413-420.

**Wittenberg, J.B., Appleby, C.A., Bergersen, F.J. y Turner, G.L.** (1975). Leghemoglobin: the role of hemoglobin in the nitrogen-fixing legume root nodule. *Annals of the New York Academy of Sciences* **244**: 28-34.

**Witty, J.F. y Minchin, F.R.** (1998). Hydrogen measurements provide direct evidence for a variable physical barrier to gas diffusion in legume nodules. *Journal of Experimental Botany* **49**: 1015-1020.

**Witty, J.F., Spot, L. y Revsbeck, N.P.** (1987). Direct evidence for changes in the resistance of legume root nodules to O<sub>2</sub> diffusion. *Journal of Experimental Botany* **38**: 1129-1140.

**Wu, L., Emberg, A. y Biggar, J.A.** (1994). Effects of elevated selenium concentration on selenium accumulation and nitrogen fixation symbiotic activity of *Melilotus indica* L. *Ecotoxicology and environmental safety* **27**: 50-63.

**Wycoff, K.L., Hunt, S., González, M.B., VandenBosch, K.A., Layzell, D.B. y Hirsch, A.M.** (1998). Effects of oxygen on nodule physiology and expression of nodulins in alfalfa. *Plant Physiology* **117**: 385-395.

**Xiong, L. y Zhu, J.K.** (2003). Regulation of abscisic acid biosynthesis. *Plant Physiology* **133**: 29-36.

**Yadav, N.K. y Vyas, S.R.** (1971). Response of root-nodule rhizobia to saline, alkaline and acid conditions. *Indian Journal of Agricultural Sciences* **41**: 875-881.



**Yakunin, A.F. y Hallenbeck, P.C.** (1998). Purification and characterization of pyruvate oxidoreductase from the photosynthetic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics* **1409**: 39-49.

**Yakunin, A.F., Hallenbeck, P.C., Troshina, O.Y. y Gogotov, I.N.** (1993). Purification and properties of a bacterial-type ferredoxin from the nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena-variabilis* ATCC 29413. *Biochimica et Biophysica Acta* **1163**: 124-130.

**Yamaguchi, K., Hayashi, M. y Nishimura, M.** (1996). cDNA cloning of thylakoid-bound ascorbate peroxidase in pumpkin and its characterization. *Plant and Cell Physiology* **37**: 405-409.

**Yamaguchi, K., Mori, H. y Nishimura, M.** (1995a). A novel isoenzyme of ascorbate peroxidase localized on glyoxysomal and leaf peroxisomal membranes in pumpkin. *Plant and Cell Physiology* **36**: 1157-1162.

**Yamaguchi, K., Takeuchi, Y., Mori, H. y Nishimura, M.** (1995b). Development of microbody membrane proteins during the transformation of glyoxysomes to leaf peroxisomes in pumpkin cotyledons. *Plant and Cell Physiology* **36**: 455-464.

**Yamamoto, A., Bhuiyan, N.H., Waditee, R., Tanaka, Y., Esaka, M., Oba, K., Jagendorf, A.T. y Takabe, T.** (2005). Suppressed expression of the apoplastic ascorbate oxidase gene increases salt tolerance in tobacco and Arabidopsis plants. *Journal of Experimental Botany* **56**: 1785-1796.

**Yamauchi, R. y Matsushita, S.** (1979). Light-induced lipid peroxidation in isolated chloroplasts and the role of  $\alpha$ -tocopherol. *Agricultural and Biological Chemistry* **43**: 2157-2162.

**Yang, W.C., Canter Cremers, H.C.J., Hogendijk, P., Katinakis, P., Wijffelman, C.A., Franssen, H., van Kammen, A. y Bisseling, T.** (1992). *In-situ* localization of chalcone synthase mRNA in pea root nodule development. *Plant Journal* **2**: 143-151.

**Yoch, D.C. y Arnon, D.I.** (1975). Comparison of 2 ferredoxins from *Rhodospirillum rubrum* as electron carriers for native nitrogenase. *Journal of Bacteriology* **121**: 743-745.

**Yoshimura, K., Miyao, K., Gaber, A., Takeda, T., Kanaboshi, H., Miyasaka, H. y Shigeoka, S.** (2004). Enhancement of stress tolerance in transgenic tobacco plants overexpressing *Chlamydomonas* glutathione peroxidase in chloroplasts or cytosol. *The Plant Journal* **37**: 31-33.

**Yost, Jr.F.J. y Fridovich, I.** (1973). An iron-containing superoxide dismutase from *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* **248**: 4905-4908.

**Young, A.J.** (1991a). The photoprotective role of carotenoids in higher plants. *Physiologia Plantarum* **83**: 702-708.

**Young, A.J.** (1991b). Inhibition of carotenoid biosyntheses. Eds. N.R. Baker, N.R. y Percival, M.P. *Herbicides*. Elsevier Publishers. pp. 131-171.

**Young, J.M.** (2003). The genus name *Ensifer* Casida 1982 takes priority over *Sinorhizobium* Chen et al. 1988, and *Sinorhizobium morelense* Wang et al. 2002 is a later synonym of *Ensifer adhaerens* Casida 1982. Is the combination "*Sinorhizobium adhaerens*" (Casida 1982) Willems et al. 2003 legitimate? Request for an Opinion. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **53**: 2107-2110.

**Yousef, A.N. y Sprent, J.I.** (1983). Effects of NaCl on growth, nitrogen incorporation and chemical-composition of inoculated and NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> fertilized *Vicia-faba* (L) plants. *Journal of Experimental Botany* **34**: 941-950.

**Yousten, A.A., Bulla, L.A. Jr, y McCord, J.M.** (1973). Superoxide dismutase in *Bacillus popilliae*, a catalaseless aerobe. *Journal of Bacteriology* **113**: 524-525.

**Yu, T., Li, Y.S., Chen, X.F., Hu, J., Chang, X. y Zhu, Y.G.** (2003). Transgenic tobacco plants overexpressing cotton glutathione S-transferase (GST) show enhanced resistance to methyl viologen. *Journal of Plant Physiology* **160**: 1305-11.

**Yuasa, T., Ichimura, K., Mizoguchi, T. y Shinozaki, K.** (2001). Oxidative stress activates ATMPK6, an Arabidopsis homologue of MAP kinase. *Plant Cell Physiology* **42**: 1012-1016.

**Zabaloy, M.C. y Gómez, M.A.** (2005). Diversity of rhizobia isolated from an agricultural soil in Argentina based on carbon utilization and effects of herbicides on growth. *Biology and Fertility of Soils* **42**: 83-88.

**Zablotowicz, R.M. y Reddy, K.N.** (2004). Impact of glyphosate on the *Bradyrhizobium japonicum* symbiosis with glyphosate-resistant transgenic soybean: a minireview. *Journal of Environmental Quality* **33**: 825-831.

**Zahran, H.H.** (1986). Effect of sodium chloride and polyethylene glycol on rhizobial root hair infection, root nodule structure and symbiotic nitrogen fixation in *Vicia faba* L. plants. *Ph.D. thesis*. Dundee University, Dundee, Scotland.

**Zahran, H.H.** (1991a). Variation in growth pattern of three Egyptian strains of *Rhizobium leguminosarum* grown under sodium chloride and ammonium nitrate treatments. *A Bulletin of the Faculty of Science. Assiut University* **20**: 161-169.

**Zahran, H.H.** (1991b). Conditions for successful *Rhizobium*-legume symbiosis in saline environments. *Biology and fertility of soils* **12** : 73-80.

**Zahran, H.H.** (1991c). Characterization of root-nodule bacteria indigenous in the salt-affected soils of Egypt by lipopolysaccharide, protein and plasmid profiles. *Journal of Basic Microbiology* **32**: 279-287.

**Zahran, H.H.** (1999). *Rhizobium*-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **63**: 968-89.



**Zahran, H.H.** (2001). Rhizobia from wild legumes: diversity, taxonomy, ecology, nitrogen fixation and biotechnology. *Journal of Biotechnology* **91**: 143-153.

**Zahran, H.H. y Sprent, J.I.** (1986). Effects of sodium chloride and polyethylene glycol on rhizobial root hair infection and nodulation of *Vicia faba* L. plants. By *Rhizobium leguminosarum*. *Planta* **167**: 303-309.

**Zahran, H.H., Rasanen, L.A., Karsisto, M. y Lindstrom, K.** (1994). Alteration of lipopolysaccharide and protein profiles in SDS-PAGE of rhizobia by osmotic and heat-stress. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* **10**: 100-105.

**Zhang, X.P., Harper, R., Karsisto, M. y Lindstrom, K.** (1991). Diversity of rhizobium bacteria isolated from the root-nodules of leguminous. *International Journal of Systematic Bacteriology* **41**: 104-113.

**Zhao, S.H., Arthur, E.L., Moorman, T.B. y Coats, J.R.** (2005). Evaluation of microbial inoculation and vegetation to enhance the dissipation of atrazine and metolachlor in soil. *Environmental Toxicology and Chemistry* **24**: 2428-2434.

**Zheng, M., Doan, B., Scheneider, T.D. y Store, G.** (1999). OxyR and SoxRS regulation of fur. *Journal of Bacteriology* **181**: 4639-4643.

**Zhou, M., Tucker, T.C., Pessarakli, M. y Cepeda, J.A.** (1992). Nitrogen-fixation by alfalfa with 2 substrate nitrogen levels under sodium-chloride stress. *Soil Science Society of America Journal* **56**: 1500-1504.

**Zhu, D. y Scandalios, J.G.** (1993). Maize mitochondrial manganese superoxide dismutases are encoded by a differentially expressed multigene family. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **90**: 9310-9314.

**Zhu, J.K.** (2001a). Plant salt tolerante. *Trends in Plant Science* **6**: 66-71.

**Zhu, J.K.** (2001b). Cell signalling under salt, water, and cold stresses. *Current Opinion In Plant Biology* **4**: 401-406.

**Zhu, J.K.** (2002). Salt, and drought stress signal transduction in plants. *Annual Review In Plant Biology* **53**: 247-273.

**Zhu, J.K.** (2003). Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Current Opinion in Plant Biology* **6**: 441-445.

**Zhu, J.K., Hasegawa, P.M. y Bressan, R.A.** (1997). Molecular aspects of osmotic stress in plants. *Critical Review of Plant Sciences* **16**: 253-277.

**Zimmermann, S. y Sentenac, H.** (1999). Plant ion channels: from molecular structures to physiological functions. *Current Opinion In Plant Biology* **2**: 477-482.

**Zurbriggen, M.** (2005a). Expression of a bacterial flavodoxin confers enhanced plant tolerance to iron starvation by functional substitution of chloroplast ferredoxin. *IPK*

Student Conference. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research. Gatersleben, Germany.

**Zurbriggen, M.** (2005b). Transgenic tobacco plants expressing a bacterial flavodoxin exhibit enhanced tolerance towards infection with the pathogen *Xanthomonas campestris*. X Congreso de la Asociación Panamericana para la Bioquímica y Biología Molecular. Pinamar, Argentina.



## **Abreviaturas**

---

AAT	Aspartato aminotransferasa
ABA	Ácido abscísico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
AOX	Alternativa oxidasa
APX	Ascorbato peroxidasa
ARA	Ensayo de reducción de acetileno
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
AsA	Ácido ascórbico
ATP	Adenosina trifosfato
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indol fosfato
BrEt	Bromuro de etidio
BSA	Albúmina de suero bovino
CAT	Catalasa
cm	Centímetro
CTAB	Bromuro de cetil-trimetil-amonio
Dct	Tranporte de ácidos dicarboxílicos
DEPC	Dietil pirocarbonato
DHA	Dehidroascorbato
DHAR	Dehidroascorbato reductasa
DIG	Digoxigenina
DO	Densidad óptica
Dpi	Días post-inoculación
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis-nitrobenzoico
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
FMN	Flavio mononucleotido
Fnr	Ferredoxina NADP <sup>+</sup> reductasa
Fld	Flavodoxina
Fr	Ferredoxina
g	Gramo
GP	Guaicol peroxidasa
GPX	Glutation peroxidasa
GR	Glutation reductasa
hGSH	Homoglutation
GSH	Glutation reducido
GSSG	Glutation oxidado
GUS	β-Glucuronidasa
h	Hora
Ig	Inmunoglobulina
IPTG	Isopropil-tiogalacto-piranosido
kDa	Kilo dalton
kg	Kilogramo
Km	Kanamicina
kV	Kilovoltio
l	Litro
Lb	Leghemoglobina
LSD	Diferencia estadística ("Least Difference Significant" del inglés)
M	Molar



MDH	Malato deshidrogenasa
MDHA	Monodehidroascorbato
MDHAR	Monodehidroascorbato reductasa
mg	Miligramo
mM	Milimolar
min	Minuto
µg	Microgramo
µl	Microlitro
µm	Micra
µM	Micromolar
µmol	Micromol
NADH	Nicotin adenin dinucleotido
NADPH	Nicotin-adenosin difosfato
NBT	Azul de nitrotetrazolio
nm	Nanómetro
nM	Nanomolar
nmol	Nanomol
OAA	Oxalacetato
PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida
pb	Pares de bases
PCD	Muerte celular programada
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEP	Fosfoenolpiruvato
PEPc	Fosfoenolpiruvato carboxilasa
PMSF	Fenil metil sulfonil fluoruro
PPT	Fosfinotricina
PSI-II	Fotosistemas
PVP	Polivinilpirrolidona
p/v	Peso/volumen
Rif	Rifampicina
ROS	Especies reactivas del oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	Transcripción reversa acoplada a la PCR
s	Segundo
SD	Desviación estandar
SDS	Dodecil sulfato sódico
SOD	Superoxido dismutasa
SS	Sacarosa sintasa
TAE	Tris Acetato EDTA
TCA	Ciclo de los ácidos tricarboxílicos
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetrametiletilendiamina
TNB	Ácido 2-nitro-5-tiobenzoico
ufc	Unidades formadoras de colonias
UTP	Uridin trifosfato
UV	Ultravioleta
wt	silvestre ("wild type" del ingles).

Reunido el tribunal que suscribe en el día  
de la fecha, acordó calificar la presente Tesis  
doctoral con SOPRESALIENTE

MADRID 10-03-06

CUM LAUDE ~~PER~~  
~~UNANIMIDAD~~